

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



LOS FÁRMACOS EPIGENÉTICOS ISOTRETINOÍNA Y TALIDOMIDA MODIFICAN
LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA
ETIOLOGÍA, DESARROLLO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER EN LA LÍNEA
CELULAR HepG2

Por

L.B.G. PATRICIA NEFERTARI RAMÍREZ FLORES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

SEPTIEMBRE, 2020

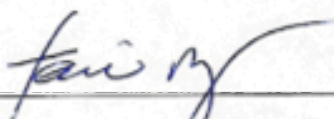
LOS FÁRMACOS EPIGENÉTICOS ISOTRETINOÍNA Y TALIDOMIDA MODIFICAN
LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA
ETIOLOGÍA, DESARROLLO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER EN LA LÍNEA
CELULAR HepG2

Comité de Tesis



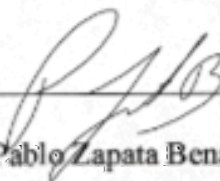
Dra. Diana Reséndez Pérez

Presidente



Dr. Fermín Mar Aguilar

Secretario



Dr. Pablo Zapata Benavides

Vocal



Dra. Adriana Sampayo Reyes

Vocal



Dra. Vianey González Villasana

Vocal

LOS FÁRMACOS EPIGENÉTICOS ISOTRETINOÍNA Y TALIDOMIDA MODIFICAN
LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA
ETIOLOGÍA, DESARROLLO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER EN LA LÍNEA
CELULAR HepG2

Dirección de Tesis



Dra. Diana Reséndez Pérez
Directora interna



Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León
Director externo

LOS FÁRMACOS EPIGENÉTICOS ISOTRETINOÍNA Y TALIDOMIDA MODIFICAN
LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA
ETIOLOGÍA, DESARROLLO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER EN LA LÍNEA
CELULAR HepG2

Por

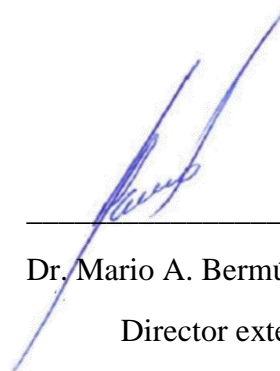
L.B.G. PATRICIA NEFERTARI RAMÍREZ FLORES

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Diana Reséndez Pérez, y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección del Dr. Mario A. Bermúdez de León.



Dra. Diana Reséndez Pérez

Directora interna



Dr. Mario A. Bermúdez de León

Director externo

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de maestría (Número de becario 894627). También agradezco el apoyo complementario otorgado por Instituto Mexicano del Seguro Social (Número de becario 97208464). A la Dra. María Elena Camacho Moll y a la Dra. Katia Peñuelas Urquides por su apoyo en la realización de los análisis de proteínas y análisis estadísticos. Al Dr. Carlos Enrique Guerrero Beltrán por el apoyo y los reactivos brindados para la realización de la inmunodetección en fase sólida, así como para la realización de los análisis densitométricos. A mis directores de tesis, la Dra. Diana Reséndez Pérez y el Dr. Mario A. Bermúdez de León por la confianza y el apoyo brindado.

A mi familia y seres amados.

Contenido

Introducción	1
Antecedentes	3
Cáncer	3
Cáncer de hígado	4
Carcinoma hepatocelular	4
Epidemiología	4
Epidemiología del HCC en México	5
Factores de riesgo	5
Signos y síntomas	7
Diagnóstico	7
Tratamiento	7
Epigenética	8
Fármacos epigenéticos	9
Reposicionamiento de fármacos	9
Isotretinoína y talidomida	10
Genes <i>RBI</i> y <i>c-MYC</i> en el desarrollo de HCC	11
Otros genes relacionados en el desarrollo de HCC	11
• <i>ARID1A</i>	12
• <i>ARID2</i>	12
• <i>CTNNB1</i>	13
• <i>TERT</i>	14
• <i>VEGF-A</i>	14
Modelo experimental	15
HepG2	15

Justificación	16
Hipótesis	17
Objetivos	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
Material y métodos	19
Cultivo celular	19
Fármacos	19
Extracción total de RNA	19
Producción de cDNA de los genes por medio de la técnica RT-PCR	20
Cuantificación de la expresión génica, por PCR Tiempo Real	20
Cuantificación de la expresión proteica en un arreglo de anticuerpos	21
Análisis de proteínas mediante Western Blot	21
Análisis estadísticos	22
Resultados	23
. Cuantificación de expresión de los genes <i>ARID1A</i> , <i>ARID2</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>TERT</i> , <i>VEGFA</i> , <i>SNAI1</i> y <i>CSF1</i> por PCR en Tiempo Real	24
Análisis de expresión proteica en presencia de isotretinoína y talidomida	27
Discusión	32
Conclusiones	37
Perspectivas	37
Material suplementario	38
Referencias	42
Resumen bibliográfico	53

Índice de tablas

Tabla 1. Proteínas modificadas en sus niveles de expresión relativa, por efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida.	29
Tabla S1. Identificación (ID) de los ensayos de expresión genética utilizados en este estudio.	41
Tabla S2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección en fase sólida.	41

Índice de figuras

Figura 1. Extracción de RNA total.	23
Figura 2. Amplificación del gen GAPDH a partir del cDNA obtenido de muestras expuestas a fármacos epigenéticos.	24
Figura 3. Comprobación de la funcionalidad de los primers y sondas para la amplificación de los genes DCN, CEACAM5 y ESR1.	25
Figura 4. Evaluación de la expresión de los genes <i>ARID1A</i> , <i>ARID2</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>TERT</i> , <i>VEGFA</i> , <i>SNAI1</i> y <i>CSF1</i> por RT-qPCR.	27
Figura 5. Análisis densitométrico de expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo del cáncer en presencia de dos fármacos epigenéticos en células HepG2.	28
Figura 6. Ensayos de inmunodetección en fase sólida para las proteínas M-CSF, SNAIL y p53 en células HepG2 expuestas a isotretinoína o talidomida por 48 h.	31
Figura S1. Análisis de regresión lineal de la eficiencia de amplificación de los genes <i>ARID1A</i> , <i>ARID2</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>TERT</i> , <i>CSF1</i> , <i>SNAI1</i> y el control endógeno <i>GAPDH</i> .	38
Figura S2. Análisis de regresión lineal de la eficiencia de amplificación de los genes <i>ARID1A</i> , <i>ARID2</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>TERT</i> , <i>CSF1</i> , <i>SNAI1</i> , respecto al control endógeno <i>GAPDH</i> .	39
Figura S3. Proteínas modificadas en sus niveles de expresión relativa, por efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida, del primer ensayo con el arreglo comercial de anticuerpos.	41

Abreviaturas:

CCD	Dispositivo de carga acoplada, por sus siglas en inglés de <i>Charge-Coupled Device</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario, por sus siglas en inglés de <i>complementary DNA</i> .
CEACAM5	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 5, por sus siglas en inglés de <i>Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 5</i>
EMT	Transición epitelio-mesénquima, por sus siglas en inglés de <i>epithelial mesenchymal transition</i> .
ERalpha	Receptor de estrógeno alfa, por sus siglas en inglés de <i>Estrogen Receptor alpha</i> .
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos, por sus siglas en inglés de <i>Food and Drug Administration</i> .
h	Hora(s).
HCC	Carcinoma hepatocelular, por sus siglas en inglés de <i>Hepatocellular Carcinoma</i> .
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social.
MEC	Matriz extracelular.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés de <i>Polymerase Chain Reaction</i> .
Primer forward	Oligonucleótido iniciador sentido.
Primer reverse	Oligonucleótido iniciador antisentido.
RNA	Ácido ribonucleico, por sus siglas en inglés de <i>Ribonucleic acid</i> .
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés de <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> .

s	Segundos.
TAM	Macrófagos asociados a tumores, por sus siglas en inglés de <i>Tumor Associated Macrophages</i> .
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular, por sus siglas en inglés de <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHB	Virus de la hepatitis B.
VHC	Virus de la hepatitis C.

Resumen:

El carcinoma hepatocelular (HCC) es la cuarta causa de muerte relacionada a cáncer a nivel mundial y la tercera en México. Las terapias farmacológicas actuales son ineficaces, con una supervivencia mínima de 5 años posteriores al diagnóstico. Dado que el desarrollo del cáncer ocurre principalmente por acumulación de mutaciones que alteran la expresión en genes supresores de tumores, genes de estabilidad y oncogenes, una posible alternativa terapéutica es el empleo de fármacos epigenéticos con capacidad de revertir patrones de expresión aberrantes. Previamente se demostró que los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida regulan la expresión del gen supresor de tumores *RBI* y el oncogén *c-MYC*, importantes en el desarrollo del HCC. El objetivo de esta tesis fue evaluar los niveles de expresión de 5 genes ampliamente reportados en el desarrollo del HCC (*ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *VEGFA*) y 2 genes (*CSF-1* y *SNAI1*) cuyo producto proteico fue modificado por efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida en la línea celular HepG2 de hepatoma humano. Para lo cual se realizaron cultivos celulares de la línea celular HepG2 con los tratamientos isotretinoína y talidomida por 48 h, de manera independiente. La expresión génica fue evaluada por RT-qPCR mientras que la expresión proteica por medio de un arreglo comercial de proteínas y confirmado por medio de inmunodetección en fase sólida. Los resultados no mostraron cambios significativos en los genes *ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *CSF1* y *SNAI1*; sin embargo, se observó un incremento en la expresión del transcrito del gen *VEGFA* por efecto talidomida ($P < 0.05$). Los tratamientos farmacológicos sobre los niveles de expresión relativa de 84 proteínas relacionadas con el desarrollo del cáncer mostraron la modificación de 27 proteínas, entre ellas se observó una reducción significativa en la expresión de M-CSF ($P < 0.001$), cambio relacionado a un buen pronóstico en el cáncer; sin embargo, también se presentaron cambios de pronóstico desfavorable como el aumento en la expresión del factor de transcripción SNAIL ($P < 0.01$). Finalmente, la confirmación de los cambios de expresión de las proteínas M-CSF, SNAIL y p53 por inmunodetección en fase sólida no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Como conclusión, la administración por 48 h con los fármacos isotretinoína y talidomida modifica la expresión de genes y proteínas relacionadas con la etiología, desarrollo y pronóstico del cáncer en la línea celular HepG2.

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth cause of cancer-related death worldwide and the third in Mexico. Current pharmacological therapies are ineffective, with survival less than 5 years after diagnosis. The cancer development occurs mainly by accumulation of mutations that modify the expression in tumor suppressor genes, stability genes, and/or oncogenes. A therapeutic approach for cancer is the use of epigenetic drugs with potential to reverse aberrant expression patterns. Epigenetic drugs isotretinoin and thalidomide have previously been shown to regulate the expression of the tumor suppressor gene *RB1* and the *c-MYC* oncogene, both key in the development of HCC. The aim of the present study was to evaluate the expression levels of five widely reported genes in the development of HCC (ARID1A, ARID2, CTNNB1, TERT, VEGFA) and two genes (CSF-1 and SNAI1) whose protein product was modified by effect of the drugs isotretinoin and thalidomide in the HepG2 cell line, derived from human hepatoma. HepG2 cells were exposed either to isotretinoin or thalidomide for 48 h. Total RNA was extracted from treated cultures and gene expression was evaluated by RT-qPCR assays, while protein levels were evaluated by a commercial protein array and after confirmed by solid phase immunodetection. The results did not show significant changes in the ARID1A, ARID2, CTNNB1, TERT, CSF1 and SNAI1 genes; however, we found an increase in the VEGFA expression by thalidomide exposure ($P < 0.05$). Analysis of relative expression levels of 84 proteins related to cancer development showed the modification of 27 proteins, including significant reduction expression of M-CSF ($P < 0.001$), which is related to good prognosis; however, we also observed changes of bad prognosis, such as the increase of SNAIL factor ($P < 0.01$). Finally, we performed the analysis of M-CSF, SNAIL and p53 proteins by solid phase immunodetection, and we did not find statistically significant differences among treatments. In conclusion, the administration of isotretinoin and thalidomide drug for 48 h in HepG2 cell line is able to modify the expression of genes and proteins related to the etiology, development and prognosis of cancer.

Introducción

El cáncer de hígado es el sexto cáncer más común y la cuarta causa principal de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, siendo el carcinoma hepatocelular (HCC) el cual representa hasta el 85% de todos los casos de cáncer primario de hígado, (Bray, Ferlay, & Soerjomataram, 2018). Aunado a lo anterior, el HCC tiene un mal pronóstico, con una supervivencia tan solo del 11% a los 5 años posteriores a su diagnóstico (Khan, Ali, Afridi, Ishtiaq, & Mehmood, 2017). En México, el HCC representa una grave problemática de salud ya que está posicionado como la tercera causa de muerte en la población (Martinez-Mier et al., 2014). Las opciones de tratamiento para el HCC son limitadas (Khan et al., 2017) y algunas ineficaces, incrementando así la tasa de mortalidad (Bray et al., 2018). Esto hace indispensable la búsqueda y el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento que puedan complementar terapias existentes y que contribuyan a mejorar la salud y calidad de vida del paciente. En años recientes una alternativa terapéutica para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer es mediante la regulación de mecanismos epigenéticos (Liu, Jiang, & Guan, 2014). La regulación epigenética se puede lograr mediante el uso de moléculas capaces de revertir las modificaciones epigenéticas en las células. Estos son denominados “fármacos epigenéticos” (Qi et al., 2016) debido a que son capaces de revertir los perfiles de expresión génica aberrantes, como sucede en el cáncer, el cual ocurre por acumulación de alteraciones en tres tipos de genes: los oncogenes, los cuales estimulan el crecimiento celular y se encuentran sobre-expresados; los genes supresores de tumores, los cuales contrariamente se encuentran disminuidos en su expresión y ya no ejercen sus funciones relacionadas con apoptosis o paro del ciclo celular; y finalmente los genes de estabilidad, que reducen las alteraciones genéticas y cuando son inactivados, las mutaciones en otros genes se producen a un ritmo mayor (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Sin embargo, a pesar de que este tipo de tratamiento es una gran alternativa, su desarrollo es difícil debido a los largos tiempos de investigación e inversiones para llevar un fármaco del concepto abstracto al producto comercializable, y a pesar de esto, cada año el 90% de los compuestos fallan durante las evaluaciones de la FDA (*Food and Drug Administration*, por

sus siglas en inglés), impidiendo su comercialización. Una alternativa que evade en gran medida estas desventajas es el reposicionamiento de fármacos, el cual busca dar un nuevo uso a fármacos que ya han sido aprobados, por lo que eluden muchas pruebas de aprobación previa y consecuentemente acortan los ciclos de desarrollo (Shahreza, Ghadiri, Mousavi, Varshosaz, & Green, 2017).

En la línea de investigación del efecto de fármacos epigenéticos en el tratamiento del cáncer hepático que se realiza en nuestro laboratorio, previamente se han evaluado 6 fármacos epigenéticos que pertenecen al catálogo básico de medicamentos del sector salud, de los cuales isotretinoína y talidomida han mostrado resultados significativos en el aumento de la expresión del gen supresor de tumores *RBI* y en la reducción de la expresión del oncogén *c-MYC*. Dichos genes se encuentran involucrados en el desarrollo del HCC donde muestran perfiles de expresión aberrantes (Anwar et al., 2014; L. Wang et al., 2014), convirtiéndolos en un blanco para tratamiento. Sin embargo, se necesitan más estudios, como la búsqueda de otros genes relacionados con la patogenia del HCC sobre los cuales también actúen estos compuestos. Por ello el objetivo de esta tesis fue evaluar los niveles de expresión de 5 genes ampliamente reportados en el desarrollo del HCC (*ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *VEGFA*,) y 2 genes (*CSF1*, *SNAI1*) cuyo producto proteico fue modificado por efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida en la línea celular HepG2 de hepatoma humano.

Antecedentes

Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se produce cuando las células experimentan un crecimiento descontrolado, teniendo la posibilidad de propagarse a un órgano distinto del cual se originó (metástasis) (American Cancer, 2016). Su desarrollo se debe mayoritariamente a la acumulación de alteraciones en tres tipos de genes: oncogenes, genes supresores de tumores y genes de estabilidad (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Se define como oncogén aquel gen que, activado por una mutación, incrementa el potencial de proliferación de la célula en que se encuentra. Los oncogenes sufren mutaciones que provocan que sean constitutivamente activos o activo en condiciones en las que normalmente no lo son. Estas activaciones pueden ser por translocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas o mutaciones intragénicas que afectan la actividad del producto (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Los genes supresores de tumores son también el blanco de mutaciones reducen o inhiben la actividad de los genes. Entre las mutaciones que inducen cambios en este tipo de genes se encuentran las deleciones e inserciones. Además, ha sido reportado una disminución de la actividad de genes supresores de tumores por modificaciones epigenéticas (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores funcionan de manera similar, pues ambos conducen el proceso neoplásico al aumentar el número de células tumorales mediante la inducción de la proliferación celular o por la inhibición de la muerte celular. El aumento de la proliferación celular puede ser causado por la activación de genes relacionados con el ciclo celular, al inhibir los procesos apoptóticos o al facilitar la angiogénesis (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Los genes de estabilidad son aquellos que controlan procesos que implican la recombinación mitótica y la segregación cromosómica (p. ej. *BRCA1* y *ATM*). Este tipo de genes mantienen la estabilidad del genoma al evitar alteraciones génicas, sin embargo, al modificar su actividad, la tasa de mutación en el genoma aumenta. Asimismo, para que se observe un

efecto fisiológico es necesario que ambos alelos de los genes de estabilidad se inactiven, como sucede con los genes supresores de tumores (Vogelstein & Kinzler, 2004).

Cáncer de hígado

Se denomina cáncer de hígado (cáncer primario de hígado) solamente a los cánceres que se originan en este órgano (American Cancer, 2016). Este se ha posicionado como la cuarta causa de muerte relacionada con cáncer en todo el mundo, provocando alrededor de 841,000 casos nuevos y 782,000 muertes anualmente (Bray et al., 2018). Este cáncer comprende un grupo heterogéneo de tumores hepáticos malignos con diferentes características histológicas entre los que se encuentran el colangiocarcinoma intrahepático, el colangiocarcinoma hepatocelular mixto, el carcinoma hepatocelular fibrolamelar, el hepatoblastoma y el carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés), siendo este último el tumor hepático maligno más común (Dhanasekaran, Bandoh, & Roberts, 2016; Sia, Villanueva, Friedman, & Llovet, 2017).

Carcinoma hepatocelular

El carcinoma hepatocelular es un tumor derivado de hepatocitos del hígado, el cual representa hasta el 85% de todos los casos de cáncer de hígado primario (Bray et al., 2018; Jiang, Al-Diffhala, & Centeno, 2018). El HCC es uno de los problemas de salud más graves en todo el mundo debido a su mal pronóstico, ya que se estima que en los pacientes diagnosticados existe solo un 11% de supervivencia a los 5 años posteriores al diagnóstico. Aunado a lo anterior, las opciones de tratamiento actuales son limitadas (Khan et al., 2017). Al igual que otros tumores sólidos, el HCC se caracteriza por los rasgos distintivos del cáncer, como lo son la proliferación celular sostenida, la elusión de los mecanismos supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la invasión, la metástasis, la angiogénesis y el metabolismo energético desregulado (Liu et al., 2014).

Epidemiología

A pesar de que las tasas de incidencia de cáncer de hígado varían entre las regiones geográficas del mundo, su incidencia es normalmente de 2 a 4 veces más altas para los

hombres que para las mujeres (Tang, Hallouch, Chernyak, Kamaya, & Sirlin, 2018). Aunque la causa de esta disparidad de géneros aún es desconocida, se cree que puede deberse a que los factores de riesgo de cáncer de hígado son más prevalentes en los hombres, así como a las diferencias en el perfil de hormonas esteroides sexuales, las respuestas inmunitarias y la epigenética (McGlynn, Petrick, & London, 2015).

Epidemiología del HCC en México

Esta enfermedad tiene un impacto crítico en México, dado que es la tercera causa de muerte en la población y la novena en incidencia. En 2018 se presentaron alrededor de 7,265 casos nuevos y 6,868 muertes (Globocan, 2018). El HCC representa más del 90% de los tumores hepáticos primarios en México (Martinez-Mier et al., 2014). El factor de riesgo principal de los pacientes con HCC, entre el 70 a 90%, es la cirrosis de hígado principalmente ocasionada por la hepatopatía alcohólica (39.5%) y la infección por el virus de la hepatitis C (36.6%) (González Huezo & Sánchez Ávila, 2014).

Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo que se han descrito que contribuyen al desarrollo del cáncer hepático se encuentran aquellos provocados por virus, toxinas, hábitos y enfermedades metabólicas.

- **Cirrosis**

Como se comentó previamente, la cirrosis es el factor de riesgo más importante para HCC. Mundialmente cerca de un 80-90% de los pacientes con HCC desarrollan cirrosis subyacente. Esto es debido a que la cirrosis es un marcador de inflamación crónica y de lesión hepática repetitiva. Además, las citocinas inflamatorias conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno y a la activación de la cascada de fibrosis hepática, lo cual acelera los ciclos celulares de los hepatocitos y con ello el riesgo de alteraciones genéticas y transformación maligna (Liu et al., 2014; Tang et al., 2018).

- **Virus de la hepatitis B**

El virus de la hepatitis B (VHB) representa al menos el 50% de los casos de HCC a nivel mundial. El VHB es una causa notoria de HCC en ausencia de cirrosis; sin embargo, la mayoría de HCC relacionado con el VHB (70-90%) se desarrolla en hígados cirróticos (McGlynn et al., 2015; Mittal & El-Serag, 2013).

- **Virus de la hepatitis C**

El virus de la hepatitis C (VHC) promueve el desarrollo de HCC mediante mecanismos directos en el cual se generan mutaciones y la transformación maligna de las células infectadas, así como por mecanismos indirectos, donde se induce la inflamación hepática y fibrosis. Lo anterior contribuye a la carcinogénesis y la apoptosis. Las proporciones de la infección crónica por VHC asociadas con el HCC es aproximadamente del 10 al 20%; sin embargo, esta proporción varía mundialmente según las áreas geográficas y sus tasas de incidencia (McGlynn et al., 2015; Tang et al., 2018).

- **Consumo de alcohol**

El alcohol se metaboliza en acetaldehído, el cual es un metabolito tóxico y carcinógeno. Su consumo crónico produce inflamación crónica en el hígado, lo que aumenta el estrés oxidativo, daño al DNA y disminución de la reparación del DNA. El consumo prolongado y excesivo de alcohol conduce a la cirrosis alcohólica, el cuál es un factor de riesgo importante en el desarrollo de hepatocarcinogénesis (Tang et al., 2018).

- **Obesidad, Diabetes Mellitus y Síndrome Metabólico**

Los trastornos metabólicos relacionados con la obesidad, la diabetes tipo II y el síndrome metabólico, esencialmente hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés), están significativamente relacionadas con el desarrollo de HCC (McGlynn et al., 2015).

- **Aflatoxinas**

Las aflatoxinas son una familia de carcinógenos producidos por especies de hongos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, y *Aspergillus nonius*. Estas

micotoxinas contaminan una gran variedad de alimentos, incluyendo maíz, cacahuetes y soja en algunas partes de Asia y África e inducen daño hepático. Por tanto, la exposición crónica a un bajo nivel de aflatoxinas en la dieta es un factor de riesgo para HCC (Tang et al., 2018). Además, existe una asociación sinérgica entre la micotoxina AFB1 y los virus de hepatitis B y C en el aumento del riesgo de HCC (McGlynn et al., 2015).

Signos y síntomas

Entre los síntomas más comunes del HCC se encuentran: pérdida de peso y apetito, náuseas o vómitos, agrandamiento del hígado, agrandamiento del bazo, dolor en el abdomen e hinchazón o acumulación de líquido en el abdomen, picazón e ictericia; algunos otros síntomas son fiebre, venas agrandadas en abdomen y moretones anormales. Además, los tumores del hígado pueden producir hormonas que actúan en otros órganos ocasionando hipercalcemia, eritrocitosis, hipoglucemia, entre otros (American Cancer, 2016).

Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico del HCC se revisan los antecedentes médicos y se realiza un examen físico. Si los síntomas y/o los resultados del examen físico sugieren que puede ser cáncer de hígado se realizan otros estudios como son la toma de imágenes entre los que se incluyen aquellos que permiten observar la forma, tamaño y ubicación de un tumor como la ecografía y la resonancia magnética. Así mismo también se realizan análisis de laboratorio como la evaluación de niveles de alfafetoproteína, calcio, glucosa y colesterol en sangre. También son utilizadas pruebas de coagulación sanguínea para evaluar la producción de factores de coagulación en hígado y pruebas de detección de hepatitis B y C, así como otros procedimientos. Otros abordajes para el diagnóstico son las biopsias para evaluar histológicamente el tumor seguido de la laparoscopia para realizar una inspección visual del órgano (American Cancer, 2016).

Tratamiento

Dada la heterogeneidad del HCC y la variabilidad de las opciones de tratamiento, la mejor terapia se determina según la etapa en la que se encuentre. Entre las opciones de tratamiento se encuentran trasplante y resección quirúrgica para etapas iniciales; la ablación tumoral química (etanol, ácido acético) o térmica (ablación por radiofrecuencia, microondas, láser, crioablación); la quimioembolización transarterial que consiste en la oclusión del suministro de sangre al tumor con una distribución local sinérgica de quimioterapia y finalmente la quimioterapia que se utiliza en pacientes con HCC que no son viables para terapias potencialmente curativas y por lo tanto su función es principalmente paliativa (American Cancer, 2016).

Sin embargo, a pesar de las opciones de tratamiento, el cáncer de hígado sigue teniendo mal pronóstico y baja sobrevivencia (Khan et al., 2017). Por tanto, es indispensable el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento que puedan funcionar en apoyo a las terapias existentes y que contribuyan a mejorar la calidad de vida del paciente. Recientemente se ha sugerido el estudio de mecanismos epigenéticos y su regulación como un nuevo enfoque alternativo para el tratamiento de varios tipos de cánceres, como se describe más adelante.

Epigenética

La epigenética es el mecanismo por el cual se regula la expresión génica sin cambios en la secuencia de DNA. La regulación epigenética de la estructura de la cromatina se logra a través de diversos enfoques, que incluyen modificaciones de histonas, metilación del DNA, RNA's pequeños no codificantes y remodelación de la cromatina (Yokoyama et al., 2017); sin embargo, estos mecanismos epigenéticos pueden conducir a la activación de oncogenes críticos o a la inactivación de genes supresores de tumores (Liu et al., 2014), lo que a su vez impulsa la proliferación celular, invasión y metástasis, conllevando al desarrollo del HCC. Por otra parte debido al potencial de reversibilidad de estas alteraciones epigenéticas ha permitido el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos para el HCC (Wahid, Ali, Rafique, & Idrees, 2017).

Fármacos epigenéticos

Los fármacos epigenéticos son compuestos químicos que pueden dirigirse a enzimas involucradas en la modificación de las histonas y la metilación del DNA (Qi et al., 2016), así como la modificación de proteínas asociadas a la cromatina (Verma & Kumar, 2018). Los fármacos epigenéticos son capaces de revertir perfiles aberrantes de expresión génica asociados con el desarrollo de cáncer. Varios de estos fármacos dirigidos a las enzimas relacionadas a la metilación del DNA y las enzimas de desacetilación de histonas han sido probados en ensayos clínicos (Szyf, 2009), y de estos resultados, algunos fármacos han sido seleccionados para tratar el HCC. Algunos ejemplos de estos son los fármacos Zebularina, Belinostat y la combinación de Panobinostat con sorafenib (Wahid et al., 2017).

Reposicionamiento de fármacos

La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos es un proceso laborioso que implica un largo periodo de investigación (10 a 15 años) y elevados costos (entre 0.8 y 1.5 mil millones de dólares) para llevar un fármaco del concepto abstracto al producto comercializable. Sin embargo, cada año el 90% de los fármacos no aprueba las evaluaciones de la FDA lo que impide su uso en la terapia. Una alternativa ante esta problemática es el reposicionamiento de fármacos, el cual involucra el hallazgo de nuevos usos para los fármacos previamente aprobados y existentes en el mercado. Una de sus principales ventajas de los fármacos comercialmente disponibles es que eluden muchas de las pruebas de aprobación (las cuales son necesarias para los compuestos terapéuticos de nuevo desarrollo), ya que dichos agentes han establecido perfiles de seguridad y farmacocinéticos, y demostraron ser seguros para los seres humanos. Esto permite la reducción de los ciclos de desarrollo de 3 a 12 años para un fármaco reposicionado y consecuentemente menores costos (Shahreza et al., 2017).

En nuestro equipo de trabajo hemos evaluado diversos fármacos para su reposicionamiento con la finalidad de analizar su capacidad de modificar el epigenoma celular como una posible terapia para el HCC. Por lo tanto y de acuerdo con lo anterior, una de las ventajas de los fármacos isotretinoína y talidomida, empleados en esta investigación, es que pertenecen al catálogo básico de medicamentos del sector salud, y en caso de ser viables para el tratamiento

del cáncer de hígado, los tiempos de aprobación para su uso terapéutico serían considerablemente menores.

Isotretinoína y talidomida

La isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) es un producto metabólico de carotenoides provitamina A y vitamina A (retinol), los cuales son absorbidos de forma gastrointestinal y metabolizado en el hígado. El metabolismo transforma el retinol en retinal, el cuál es a su vez oxidado irreversiblemente en ácido retinoico y ácido 13-cis-retinoico mediante enzimas del citocromo P450. Posteriormente la isotretinoína y el ácido retinoico son metabolizados en a 4-oxo-isotretinona y oxo-ácido retinoico, respectivamente y ambas alcanzan concentraciones estables en sangre dentro de los 10 días de iniciada la administración a dosis de 40 mg, dos veces al día. La isotretinoína tiene una vida media de 20 horas y se une a proteínas del plasma con alta afinidad, principalmente albúmina (Wiegand & Chou, 1982). Este fármaco es usado como tratamiento para acné severo, leucemia promielocítica aguda y neuroblastoma. Entre sus efectos secundarios se encuentran: reseca de las membranas mucosas, sangrado nasal, sequedad de la piel, labios y ojos, eritema facial, dolores musculares, entre otros (Brzezinski, 2017). Algunos de los efectos adversos con los que se ha asociado esta enfermedad son perturbaciones menstruales, enfermedad intestinal inflamatoria y teratogenicidad en fetos (Brzezinski, 2017; Melnik, 2017).

La talidomida es un agente farmacológico que se utilizó ampliamente a principios de los años 50 para el tratamiento de náuseas en mujeres embarazadas, siendo prohibida en 1960 debido a los efectos teratogénicos que causaba en los fetos (Sudulaguntla, Joy, M, & Vinod, 2018). Además de esto, otros efectos adversos con los que se ha relacionado este medicamento se encuentran la neuropatía, trombosis, emesis, entre otros (Dimopoulos & Eleutherakis-papaiakovou, 2004). A pesar de sus efectos adversos este medicamento ha mostrado ser efectivo en el tratamiento de la lepra y el mieloma múltiple (aprobado por la FDA en 1998) debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antipiréticas y antiangiogénicas. Además, la talidomida se ha probado en otros tipos de cáncer; sin embargo el mecanismo exacto por el cual actúa sigue siendo aún desconocido, aunque se cree que actúa inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) así como la supresión

del TNF α . Además la talidomida puede regular la producción de varias citocinas, incluidas la interleucina-2 y el interferón γ , para modular las funciones de las células NK y las células T (Gao, Wang, Fan, & Hu, 2020; Sudulaguntla et al., 2018). Este fármaco ha demostrado tener un efecto inhibidor sobre la actividad de las histonas deacetilasas, incluso mayor que la tricostatina A, un conocido inhibidor de desacetilasas de histonas (Zahran, Gamal-eldeen, & Agwa, 2014).

Genes *RBI* y *c-MYC* en el desarrollo de HCC

En el desarrollo y progresión del carcinoma hepatocelular se han involucrado ampliamente las mutaciones del gen supresor de tumores *RBI* (Anwar et al., 2014; Di Fiore, D'Anneo, Tesoriere, & Vento, 2013) y del oncogén *c-MYC* (L. Wang et al., 2014), mostrando perfiles de expresión alterada. En nuestro grupo de investigación, estos dos genes fueron previamente evaluados mostrando tanto una disminución significativa en los niveles de expresión de *c-MYC* ($P < 0.001$), así como un aumento significativo en la expresión del gen *RBI* ($P < 0.01$) por efecto de la administración de los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida en la línea celular HepG2. Sin embargo, es importante analizar si estos mismos fármacos epigenéticos tienen la capacidad de regular otros genes supresores de tumores y oncogenes relacionados al desarrollo del HCC.

Otros genes relacionados en el desarrollo de HCC

Como previamente se ha mencionado, la acumulación de alteraciones en los genes involucrados en cáncer y las vías asociadas, son los principales factores desencadenantes de la hepatocarcinogénesis y progresión tumoral (Schulze, Nault, & Villanueva, 2016). Gracias a las tecnologías de secuenciación profunda se ha proporcionado un panorama amplio de las muchas alteraciones genéticas del HCC y se han identificaron un promedio de 30-40 mutaciones por tumor (Schulze et al., 2016; Zucman-Rossi, Villanueva, Nault, & Llovet, 2015). Por citar algunas, las alteraciones aberrantes de *TERT* junto a *CTNNB1* y *TP53* son unas de las alteraciones somáticas más comunes observadas en el HCC (Schulze et al., 2016). Con base en los antecedentes en la literatura de la frecuencia de mutación y recurrencia para el desarrollo del HCC, en esta tesis nos centraremos concretamente a la evaluación de dos

genes supresores de tumores (*ARID1A* y *ARID2*) y tres oncogenes (*CTNNB1*, *TERT* y *VEGFA*), los cuales son descritos a continuación:

- ***ARID1A***

Es un gen supresor de tumores (Wu and Roberts, 2013) que codifica a la proteína BAF250a, una de las dos subunidades ARID1. BAF250a tiene un dominio de unión al ADN que se une específicamente a secuencias de ADN ricas en AT y se cree que confiere especificidad al complejo de remodelación de la cromatina SWI-SNF, al cual pertenece. Este complejo utiliza la actividad helicasa dependiente de adenosina trifosfato para permitir el acceso de activadores transcripcionales y represores al ADN. Por lo tanto, esta proteína está involucrada en procesos de regulación que incluyen reparación del DNA y supresión de la proliferación (Jones et al., 2012). Se ha relacionado a *ARID1A* con el desarrollo de HCC ya que se ha reportado una frecuencia de mutación de hasta un 28% en este tipo de cáncer (Shibata & Aburatani, 2014). Estas mutaciones pueden ser del tipo inserción/delección y conducen a la regulación negativa de la proteína codificada y su alteración promueve la proliferación de células cancerosas. Además, la E-cadherina (proteína que regula la adhesión celular) se correlaciona fuertemente con *ARID1A*. La pérdida de E-cadherina disminuye la adhesión celular y aumenta motilidad celular. Se cree que la disminución de la expresión de *ARID1A* en los tejidos del HCC pueda debilitar las uniones célula-célula, promoviendo la migración y capacidad invasiva de las células tumorales (He et al., 2015).

- ***ARID2***

Este gen supresor de tumores codifica un miembro de la familia de proteínas de unión a ADN que contiene el dominio interactivo rico en AT (ARID). Esta proteína funciona como una subunidad del complejo remodelador de la cromatina PBAF (SWI / SNF-B) o el factor asociado a BRG1 y polybromo, facilitando la activación transcripcional dependiente de ligando por el receptor nuclear (Hong Zhao et al., 2011). *ARID2* es esencial para la estabilidad del complejo PBAF. Se han identificado tres tipos de mutaciones en este gen asociadas HCV en el desarrollo de HCC, entre las que se encuentran: desplazamiento del marco de lectura, las mutaciones sin sentido y las alteraciones en los sitios de *splicing*. Estas alteraciones pueden truncar e inactivar a la proteína *ARID2*, de las cuales algunas

mutaciones alteran únicamente a los motivos “dedos de zinc”, lo cual indica importancia de estos motivos en la actividad biológica de ARID2 (Hong Zhao et al., 2011). La tasa de frecuencia de este gen en el desarrollo de HCC es hasta del 18% (Shibata & Aburatani, 2014).

- ***CTNNB1***

Las mutaciones en el protooncogén *CTNNB1* se encuentran entre las alteraciones genéticas más frecuentes en HCC (hasta en el 40%). Estas mutaciones se producen predominantemente en el exón 3 del gen, en una región que codifica la secuencia de proteína que contiene los sitios de consenso para la fosforilación, esto previene la fosforilación de la β -catenina y su posterior degradación (S. Lee et al., 2016). La señalización de β -catenina en particular es una de las características clave de la hepatocarcinogénesis, ya que la desregulación de la señalización de Wnt/ β -catenina está frecuentemente alterada en el HCC. Esta vía se asocia con una gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos, que incluyen patrones de regulación embrionarios, proliferación celular, diferenciación celular, angiogénesis y cáncer. La señalización Wnt se inicia mediante la unión de proteínas ligando Wnt a sus receptores afines. Esto puede provocar diferentes modos de señalización celular, ya sea mediada por β -catenina (canónicos) o independiente de esta proteína (no canónicos). La señalización canónica de Wnt/ β -catenina normalmente no está activa en tejidos de individuos adultos (excepto por varios nichos de células madre). En este estado sin señalización, la β -catenina citosólica se fosforila continuamente en los residuos Ser33, Ser37, Thr41 y Ser45 localizados en el exón 3 por un complejo multiproteico entre los que se encuentran la axina y APC. Estas fosforilaciones causan que la β -catenina sea reconocida y poliubiquitinada para su degradación en el proteosoma. Esto ocasiona que la β -catenina citosólica este mínimamente disponible para la señalización nuclear y, por lo tanto, la transcripción génica mediada por Wnt está ausente en condiciones normales. Al unirse los ligandos Wnt al receptor FZD y correceptores, se transfiere la señal biológica a la proteína *Dishevelled*, reclutándose a la membrana; este evento provoca el desensamblaje del complejo multiproteico de destrucción de β -catenina. Esto da como resultado el rescate de β -catenina de la degradación proteasomal y por tanto la acumulación de β -catenina en el citoplasma, lo que finalmente causa la

translocación de β -catenina al núcleo en donde se une a factores de transcripción de genes diana Wnt entre los que se incluyen *AXIN2* y *MYC* (W. Wang, Pan, Fuhler, Smits, & Peppelenbosch, 2017).

- ***TERT***

La activación aberrante del gen *TERT* es la alteración somática más común observada en el HCC (70%) (Schulze et al., 2016). Las alteraciones en este gen ocurren por mutaciones somáticas en su promotor, las cuales incluyen 2 *hot spots* (C228T y C250T) identificados en varios tipos de tumores. Además, se ha reportado que estas mutaciones son los primeros eventos genéticos en el proceso de hepatocarcinogénesis. El gen *TERT* codifica para la subunidad catalítica del complejo de telomerasa, encargado de mantener la longitud de los telómeros al final de los cromosomas (S. Lee et al., 2016), lo que evita el acortamiento de los telómeros (asociado a roturas de la doble cadena del DNA, inestabilidad genómica y senescencia). Por el contrario, la sobreexpresión de la telomerasa está implicada en los mecanismos de la tumorigénesis, al alargar los telómeros y ayudar a immortalizar las células, lo que beneficia la supervivencia de las células cancerosas (Rao, Asch, & Yamada, 2017).

- ***VEGF-A***

Este protooncogén codifica a la proteína del factor de crecimiento endotelial vascular, la cual es de unión a heparina. Este factor de crecimiento induce la proliferación y la migración de células endoteliales vasculares, y es esencial para la angiogénesis tanto fisiológica como patológica. Este gen está regulado positivamente en muchos tumores conocidos y su expresión está correlacionada con el estadio y la progresión del tumor (Karaman, Leppänen, & Alitalo, 2018). Amplificaciones focales en 6p21, que contienen el locus *VEGFA*, se producen en 7-10% de carcinoma hepatocelular. VEGF estimula la secreción paracrina del factor de crecimiento de hepatocitos por las células del estroma, lo que induce la progresión del tumor. La sobreexpresión de *VEGF-A* en células HCC induce regulación a la alza de HGF y a un aumento de la proliferación y características pro-angiogénicas (Borja-Cacho & Matthews, 2008).

Modelo experimental

HepG2

HepG2 es una línea celular de carcinoma de hígado humano que se derivó del tejido hepático de un varón caucásico americano de 15 años en ausencia de infección viral. Las células son de morfología epitelial adherentes, que crecen como monocapas en pequeños agregados y tienen un número de cromosómico de 55 (Costantini, Di Bernardo, Cammarota, Castello, & Colonna, 2013). Esta línea se ha utilizado ampliamente como modelo *in vitro* del hígado humano porque estas células presentan un alto grado de diferenciación morfológica y funcional *in vitro*, son fáciles de manejar, no contienen virus y generan resultados reproducibles. Las células HepG2 son utilizadas ampliamente para estudios toxicológicos del metabolismo hepático y los efectos tóxicos de xenobióticos así como en estudios farmacológicos sobre farmacogenética y carcinogénesis (Tyakht et al., 2014).

Justificación

El carcinoma hepatocelular es la cuarta causa de muerte a nivel mundial y la tercera en México, estimándose que la tasa de muerte aumente en los próximos años. Los tratamientos actuales son ineficaces, y la supervivencia posterior a los 5 años del diagnóstico es mínima, por lo cual el HCC representa una gran problemática de salud. Por ello, se requiere la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que aumenten la expectativa de vida del paciente y mejoren su calidad de vida. Debido a que el desarrollo de cáncer se da por acumulación de mutaciones que alteran la expresión en genes supresores de tumores, genes de estabilidad y oncogenes, una alternativa terapéutica prometedora es el empleo de fármacos epigenéticos, los cuales tienen la capacidad de revertir estos patrones de expresión aberrantes. En cáncer hepático, los genes supresores de tumores y oncogenes se encuentran desregulados, lo cual disminuye la eficiencia de los tratamientos para HCC. En nuestro laboratorio hemos demostrado que los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida, pertenecientes al catálogo de medicamentos básico del sector salud, regulan la expresión de los genes *RBI* y *c-MYC*, convirtiéndolos en potenciales terapias en el tratamiento del HCC y teniendo la ventaja que al ser fármacos ya aprobados en seguridad y eficacia se reducirán los tiempos de evaluación para este nuevo uso. Por lo anterior, se sugiere que los fármacos isotretinoína y talidomida pueden regular la expresión de otros genes supresores de tumores y oncogenes involucrados en el desarrollo del HCC.

Hipótesis:

- Los fármacos epigenéticos isotretinoína y talidomida son capaces de modificar la expresión de genes que participan en la patogenia del cáncer hepático humano.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la expresión de un grupo de genes y proteínas humanas involucrados en la patogenia del cáncer hepático por efecto de dos fármacos epigenéticos en una línea celular de hepatoma humano.

Objetivos específicos

- Evaluar los niveles de expresión de dos genes supresores de tumores (*ARID1A*, *ARID2*) y tres oncogenes (*CTNNB1*, *TERT*, *VEGFA*), por efecto de isotretinoína y talidomida, en la línea celular HepG2.
- Evaluar los niveles relativos de expresión de 84 proteínas humanas relacionadas con desarrollo del cáncer por efecto de isotretinoína y talidomida en la línea celular HepG2.

Material y métodos

Cultivo celular

Las células HepG2, obtenidas en la *American Tissue Culture Collection* (ATCC HB-8065), se cultivaron en medio DMEM adicionado con 4.5 g/L de glucosa, 2.5 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, USA), y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco).

Fármacos

Los fármacos isotretinoína y talidomida fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y se manejaron de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Los fármacos fueron diluidos en DMSO al 0.1% y las células fueron tratadas con estos a una concentración de 10 μ M del fármaco isotretinoína y 10 μ g/mL del fármaco talidomida por 48 h.

Extracción total de RNA

Se realizaron extracciones de RNA total a los cultivos celulares, usando el reactivo TRIzol® (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del proveedor. Se agregaron 800 μ L del reactivo TRIzol® por 5 min para disgregar las membranas celular y nuclear, y 200 μ L de cloroformo por otros 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 12,000 g por 15 min a 4°C para la separación de la fase acuosa con el RNA, y la precipitación se realizó mediante la adición de 500 μ L de isopropanol e incubación por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la centrifugación a 12,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y la pastilla de RNA fue lavada con 1 mL de etanol al 75% e inmediatamente se centrifugó nuevamente a 7,500 g por 5 min a 4°C y se eliminó el etanol. Finalmente, se permitió que la muestra evaporara las trazas de etanol y se resuspendió en 25 μ L de agua libre de nucleasas.

La calidad del RNA extraído se valoró mediante parámetros de pureza, concentración e integridad. La pureza fue determinada por una relación en la absorbancia de 260/280 nm (>1.7) y concentración mayor a 100 ng/ μ L, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™

(Thermo Fisher). Finalmente, la integridad fue evaluada mediante separación electroforética en gel de agarosa al 1% teñido con el reactivo GelRed (Biotium).

Producción de cDNA de los genes por medio de la técnica RT-PCR

La síntesis del DNA complementario (cDNA), a partir de las muestras de RNA se realizó con ensayos de transcripción reversa utilizando el protocolo *M-MVL Reverse Transcriptase* de Invitrogen®, de acuerdo con las instrucciones del proveedor (utilizando 2 µg de RNA total en un volumen de 20 µL de reacción). Para la reacción se prepararon dos mezclas: la Mezcla 1 que contenía RNA (a una concentración ajustada) junto con los random primers (50 ng/µL) y dNTP's (10 mM) y se incubaron a 65 °C por 5 min. Inmediatamente transcurrido ese tiempo se colocó en hielo para agregar la mezcla 2, la cual contenía *First Stand buffer* (5X), DTT (0.1 M) y *RNase OUT* (40 U/µL) (Invitrogen). El tubo con ambas mezclas se centrifugó y posteriormente se incubó a 37 °C por 2 min. Posteriormente se agregó 1 µL de la enzima M-MLV RT (200 U/µL) y se mezcló suavemente por pipeteo. Finalmente, la mezcla se incubó 50 min a 37°C e inactivó por calor a 70°C por 15 min. La funcionalidad del cDNA obtenido se determinó por medio de la amplificación del gen *GAPDH* por PCR (Figura 2).

Cuantificación de la expresión génica, por PCR Tiempo Real

Para la evaluación de la expresión genética, se realizó la determinación del rango dinámico de amplificación con base en diluciones seriales de 1:16 a 1:1024. Los niveles de expresión de los genes se determinaron mediante una PCR cuantitativa (qPCR) con primers y sondas específicas (Tabla S1), empleando el *Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems). La reacción de qPCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µL con 10 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µL primers/sonda, 3 µL de cDNA y 6 µL de agua libre de nucleasas. La amplificación de las muestras se llevó a cabo bajo condiciones estándar con una incubación inicial a 50 °C por 2 min, seguido de 95 °C por 10 min, y posteriormente por 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Para la normalización de los niveles de expresión se utilizó como control endógeno al gen *GAPDH* bajo las mismas

condiciones. Cada muestra se realizó por triplicado técnico y los datos obtenidos fueron procesados utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Cuantificación de la expresión proteica en un arreglo de anticuerpos

Los niveles relativos de expresión de 84 proteínas humanas relacionadas con el desarrollo del cáncer se determinaron mediante el kit *Proteome Profiler Human XL* (ARY026; R&D systems, MN), por duplicado biológico. Se realizaron lisados celulares (1×10^7 células/mL) por choque térmico de los tratamientos control, isotretinoína y talidomida. Después de lo cual, la cantidad de muestra se ajustó a 200 µg de proteína por membrana, posteriormente se siguieron las especificaciones del proveedor. Las membranas fueron expuestas a una película de rayos X durante 1, 3, 5, 10, 15 y 60 min. Para determinar los niveles de expresión proteica se utilizó el software Fiji para el análisis densitométrico e interpretación de los datos.

Análisis de proteínas mediante Western Blot

De las muestras previamente obtenidas de los lisados celulares utilizados para el arreglo comercial de anticuerpos, se realizó una electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 10% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y usando una concentración de 30 µg de proteína por muestra. La electroforesis se realizó a 75V por 25 min y posteriormente a 120V por cerca de 50 min, utilizando el equipo *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (BioRad). La transferencia de las proteínas se realizó a una membrana PVDF, utilizando la *Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad) por 2 h a 15 V. Posteriormente se realizó el bloqueo con 5% de leche descremada (Svelty®) en buffer TBS 1X durante 1 h en agitación a 300 rpm y enseguida se procedió a lavar la membrana con TBST para eliminar los restos del bloqueo. Se realizaron las diluciones correspondientes de los anticuerpos primarios como se muestra en la Tabla S2. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C, 300 rpm, seguido de esto se realizaron lavados con TBST 1X a 300 rpm por 5, 10 y 15 min eliminando entre cada intervalo el TBST y se procedió a incubar con el anticuerpo secundario correspondiente del kit *GE healthcare amersham ECL western blotting analysis system* con TBST 1X durante una hora a temperatura ambiente con agitación constante a 300 rpm seguido de lavados. Posterior a esto, la membrana se transfirió a un acetato y se añadió

la solución reveladora e incubó la reacción por 1 min, finalmente se detectó la quimioluminiscencia por medio del *ChemiDoc XRS+ System*.

Análisis estadísticos

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar el tipo de distribución de las muestras de los tratamientos (control, isotretinoína y talidomida); al presentar una distribución normal se procedió a analizar los promedios de los grupos por medio de un ANOVA de una vía y además se realizó la prueba post hoc de Dunnett. Un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron empleando el paquete estadístico GraphPad Prism 8.

Resultados

Se extrajo RNA total partir de los cultivos celulares HepG2 expuestos por 48 h a los tratamientos de isotretinoína (10 μ M) o talidomida (10 μ g/mL). Para determinar el grado de pureza de las muestras de RNA extraídas se midió la relación de absorbancia 260/280 nm, obteniendo valores superiores a 1.7; para observar la integridad de éstas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y se observaron bandas de los RNA´s ribosomales 28 y 18S (Figura 1). Por lo tanto, las muestras fueron consideradas como adecuadas para los experimentos posteriores.

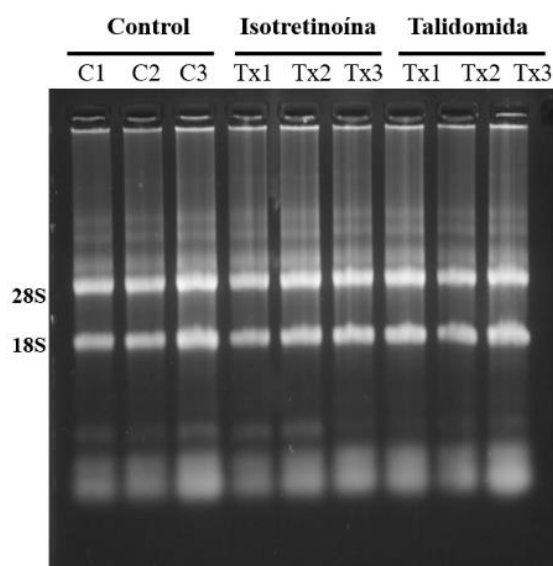


Figura 1. Extracción de RNA total. La integridad de las muestras de RNA se visualizó con base en la presencia de las bandas 28S y 18S. Se muestra una imagen representativa de las muestras separadas en gel de agarosa al 1%. Tx, tratamientos; C, controles.

Con el RNA extraído, se generó el cDNA como se detalla en los Materiales y Métodos. Para comprobar la funcionalidad del cDNA, se realizó un ensayo de PCR para la amplificación del gen *GAPDH*, observándose el producto de amplificación esperado de 377 pb (Figura 2).

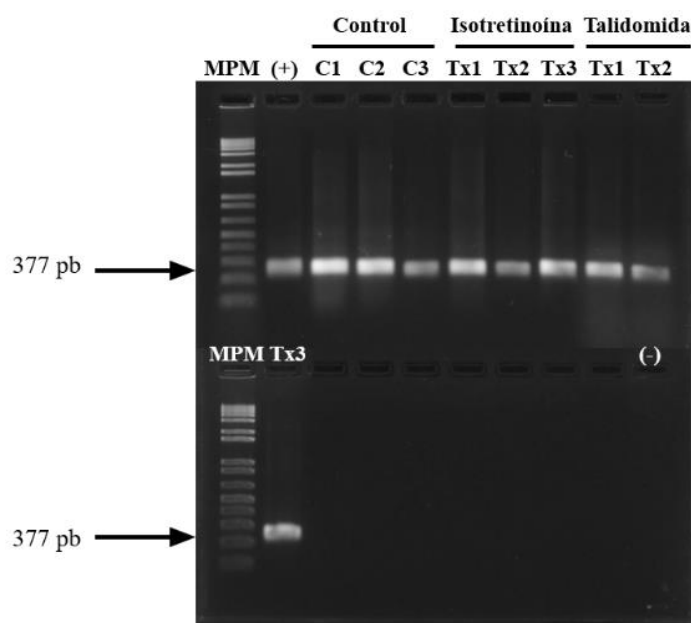


Figura 2. Amplificación del gen *GAPDH* a partir del cDNA obtenido de muestras expuestas a fármacos epigenéticos. Se señalan los productos de amplificación específicos de 377 pb correspondientes al gen *GAPDH*. MPM, marcador de peso molecular; (-), control negativo; (+), control positivo; Tx, tratamientos; C, controles.

Cuantificación de expresión de los genes *ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *VEGFA*, *SNAIL* y *CSF1* por PCR en Tiempo Real

Para establecer las condiciones que permitan que los análisis de expresión génica en tiempo real sean confiables, primero se estableció el rango dinámico de amplificación de los genes a evaluar, para lo cual se utilizó una concentración inicial de 2 µg de RNA para cada muestra. Posteriormente, se realizaron diluciones seriales de una de las muestras de cDNA control (diluciones 1:16 - 1:1024) y se seleccionó la dilución 1:128 como la más apropiada para los siguientes ensayos (Figura S1). En el caso de *VEGFA*, este gen ya ha sido previamente estandarizado en nuestro grupo de trabajo por lo que se trabajó directamente con este a la dilución 1:128. Para la normalización de los resultados de análisis de expresión se obtuvieron valores de pendientes dentro del rango de $-3.3 \pm 10\%$ lo cual refleja una eficiencia de amplificación del $100\% \pm 10\%$ y valores de $R > 0.99$, lo que proporcionan un alto grado de confianza en la correlación del ciclo umbral con la concentración de RNA (Figura S1). Además, se validó la eficiencia de amplificación de los genes blanco con respecto a la

amplificación del control endógeno y se obtuvieron valores de pendientes que se ajustaban en el rango de >-0.1 y <0.1 (Figura S2), lo que confirma la correcta ejecución del ensayo. Por lo anterior, se procedió a determinar los niveles de expresión de 5 genes involucrados en la patogenia del HCC que fueron seleccionados con base a la literatura (*ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT* y *VEGFA*) y de los genes que codifican a las proteínas modificadas en el arreglo comercial (*DCN*, *SNAI1*, *CEACAM5*, *CSF1* y *ESR1*) como se muestra en la Figura 4.

En el caso de los genes *DCN*, *CEACAM5* y *ESR1*, no se observó señal de expresión cuando se realizaron los rangos dinámicos de amplificación, por lo que se procedió a comprobar la funcionalidad de los primers y sondas para cada gen empleando controles positivos y muestras diluidas, observándose expresión nula de *DCN* y *CEACAM5*, y una muy baja expresión de *ESR1* en la línea celular HepG2 (Figura 3).

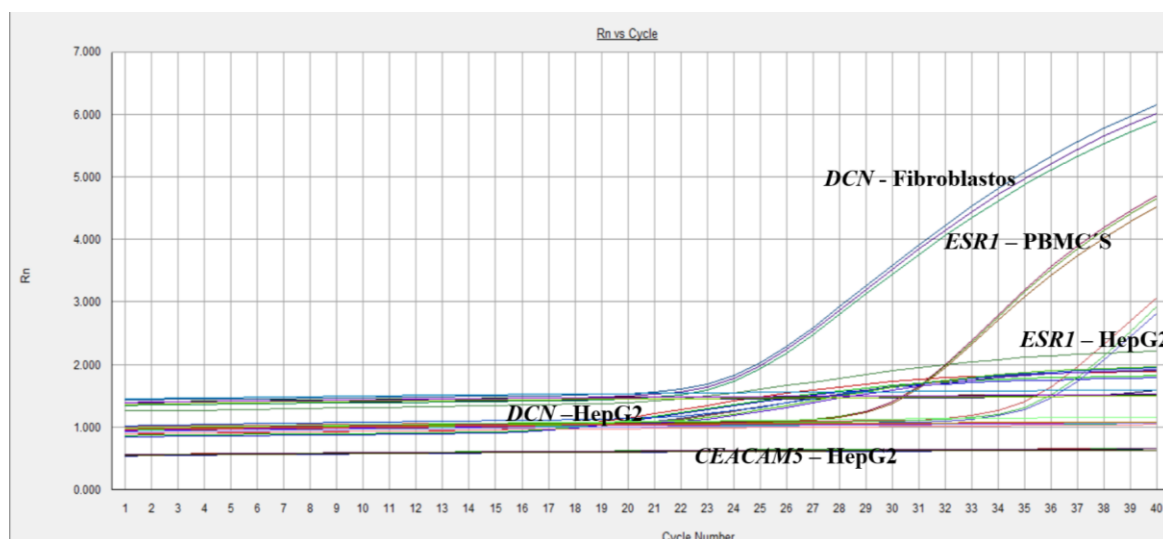


Figura 3. Comprobación de la funcionalidad de los primers y sondas para la amplificación de los genes *DCN*, *CEACAM5* y *ESR1*. Se muestra la fluorescencia normalizada del fluoróforo reportero de cada sonda probada en relación al ciclo de detección. Las líneas celulares usadas como controles están indicadas.

En el caso de los genes *ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *SNAI1* y *CSF1*, se observó que no hay cambios significativos entre el grupo control y los tratamientos. En el caso del gen

VEGFA, se observó un incremento estadísticamente significativo ($P < 0.05$) por efecto de talidomida con respecto al grupo control (Figura 4).

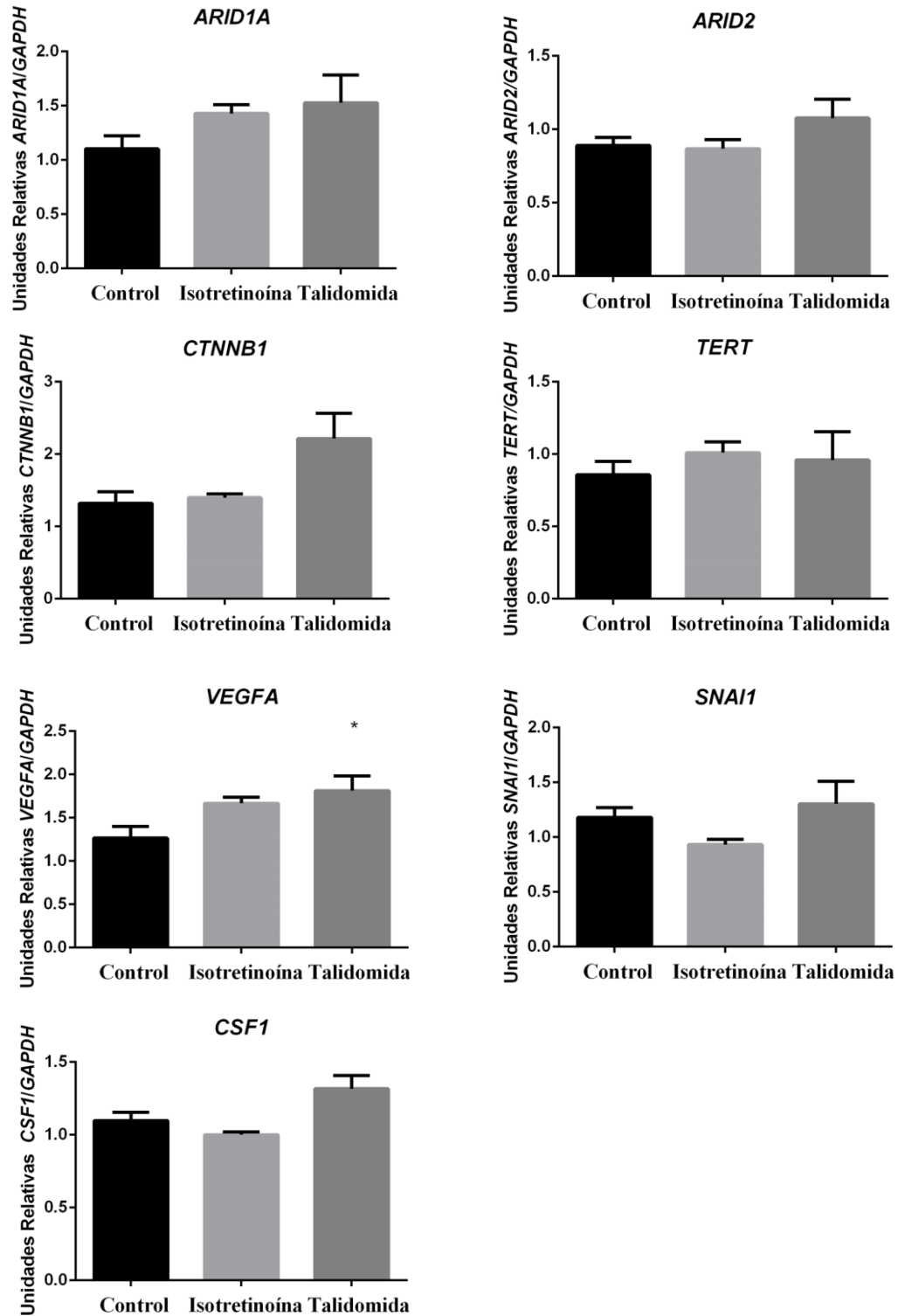


Figura 4. Evaluación de la expresión de los genes *ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *VEGFA*, *SNAIL* y *CSFI* por RT-qPCR. Los resultados de la PCR cuantitativa fueron normalizados sobre la expresión del control endógeno *GAPDH* y están expresados en unidades relativas (UR). Los resultados mostrados se obtuvieron mediante la comparación de los promedios de las UR de cada tratamiento \pm S.E.M. En el eje de las abscisas se muestran los grupos experimentales realizados * ($P < 0.05$).

Análisis de expresión proteica en presencia de isotretinoína y talidomida

Con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos isotretinoína y talidomida sobre los niveles de expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo del cáncer, 84 proteínas fueron analizadas simultáneamente utilizando un arreglo comercial como se describe en los Materiales y Métodos. En la Figura 5A se muestran los ensayos obtenidos en las membranas comerciales, y en la Figura 5B se grafican los análisis densitométricos obtenidos de las membranas. Los resultados mostraron cambios significativos en los niveles de expresión de 27 proteínas (Tabla 1). Como se puede observar en la Figura 5B, se observaron incrementos significativos de CEACAM5, Decorina, ERalpha y SNAIL en los tratamientos de isotretinoína y talidomida con respecto al control. Por otro lado, se observó una disminución significativa ($P < 0.001$) de M-CSF en ambos tratamientos con respecto al grupo control. Por lo anterior, dado los resultados obtenidos, se decidió confirmar los niveles de las proteínas en los mismos extractos celulares por medio de inmunodetección en fase sólida (Figura 6).

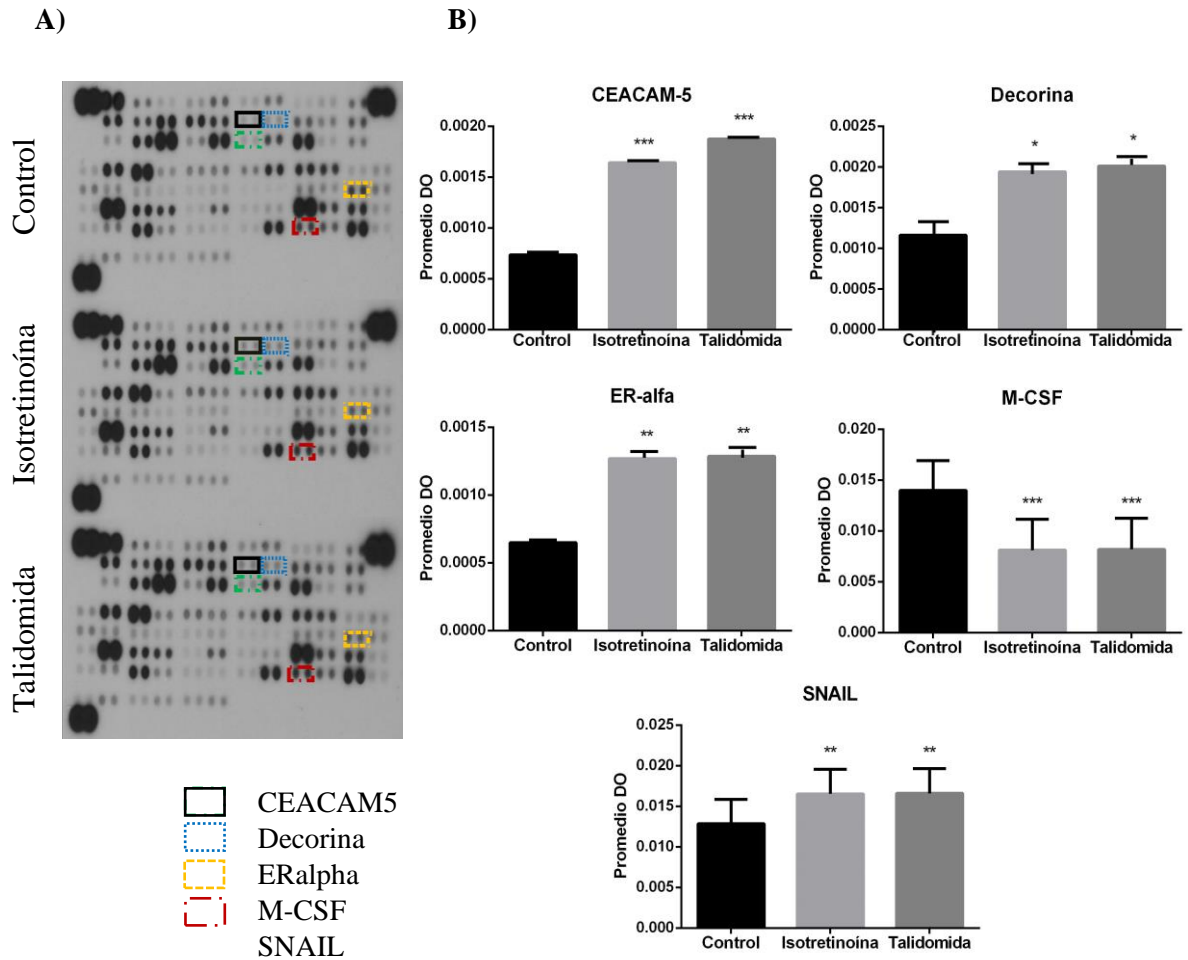


Figura 5. Análisis densitométrico de expresión de proteínas relacionadas con el desarrollo del cáncer en presencia de dos fármacos epigenéticos en células HepG2. (A) Se utilizó el Human XL Oncology Array para determinar proteínas modificadas en su expresión por efecto de isotretinoína y talidomida. Las membranas mostradas fueron reveladas a los 15 minutos de exposición. B) Proteínas seleccionadas para evaluar a nivel de expresión génica, en tiempo real. La expresión proteica fue evaluada después de 48 h con los tratamientos. El análisis se realizó por medio de Fiji, expresado como valor medio de la densidad óptica (DO) de la expresión relativa proteica, \pm S.E.M. Isotretinoína [10 μ M]; Talidomida [10 μ g/mL]. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$).

Tabla 1. Proteínas modificadas en sus niveles de expresión relativa, por efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida

Proteína	Modificación	Codificada por:	Importancia en cáncer
Axl	Aumentada por isotretinoína y talidomida ($P < 0.05$).	Oncogén	Receptor de unión al factor de crecimiento GAS6, involucrado en crecimiento e invasión de células tumorales (H. J. Lee, Jeng, Chen, Chung, & Yuan, 2014).
CA125/ MUC16	Aumentada por talidomida ($P < 0.01$)	Oncogén	Activa diferentes vías de señalización como la activación de la vía β -catenina involucrada en la transcripción de genes relacionados con la proliferación celular, activación de la vía MAPK, regulando funciones de proliferación y diferenciación y represión de p53 (Kufe, 2009).
Catepsina D	Disminuida por isotretinoína ($P < 0.01$)	Oncogén	Es una aspartil proteinasa lisosomal, relacionada con la invasión tumoral y la metástasis a través de varios mecanismos asociados con su actividad proteolítica como degradación de la MEC (Huang et al., 2000).
CEACAM5	Aumentada por isotretinoína y talidomida ($P < 0.001$)	Gen supresor de tumores	Evita el proceso de Anoikis al promover interacciones de receptores de integrinas con los componentes de la matriz extracelular (Zińczuk et al., 2019).
Decorina	Aumentada por isotretinoína y talidomida ($P < 0.05$)	Gen supresor de tumores	Bloqueo de receptores involucrados en carcinogénesis angiogénesis y proliferación como EGFR, Met, IGF-IR, PDGFR and VEGFR2 (Horváth et al., 2014).
Dkk-1	Disminuida por isotretinoína ($P < 0.05$), aumentada por talidomida ($P < 0.01$)	Oncogén	Promueve la migración e invasión celular a través de la sobreexpresión de la vía B-catenina/MMP7 (L. Chen, Li, Li, Wang, & Xie, 2013).
Endoglina/ CD105	Aumentada por isotretinoína ($P < 0.05$)	Oncogén	Correceptor de TGF- β y marcador de células endoteliales activadas, involucrado en angiogénesis (Kasprzak & Adamek, 2018).
ERalpha/ NR3A1	Aumentada isotretinoína y talidomida ($P < 0.01$)	Oncogén	Factor de transcripción represor de MTA1 (Deng et al., 2015).
ErbB2	Aumentada por isotretinoína y talidomida ($P < 0.05$)	Oncogén	Receptor del factor de crecimiento epidérmico, involucrado en señales de proliferación y diferenciación (Shi et al., 2019; Wen et al., 2015).
FGF basic	Aumentada por talidomida ($P < 0.05$)	Oncogén	Actúa como un mitógeno, además de estimular angiogénesis y migración celular (Sachiko et al., 2001).
IL-2 Ra	Aumentada por isotretinoína ($P < 0.05$)	Oncogén	Las células tumorales producen factores que facilitan el desarrollo de Treg ($CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$) (Zhu et al., 2011), las cuales se encuentran asociadas con las respuestas inmunes antitumorales defectuosas, permitiendo que las células tumorales evadan la vigilancia inmunológica (Feng, Li, Ye, & Long, 2011).
Kalikeína 6	Aumentada por isotretinoína ($P < 0.05$)	Oncogén	Degradación de componentes de la MEC (Yu et al., 2015).

M-CSF	Disminuida por isotretinoína y talidomida ($P < 0.001$)	Oncogén	Inducción de producción citocinas th2 y polarización a macrófagos M2 (Kono et al., 2016).
MMP-2	Disminuida por talidomida ($P < 0.01$)	Oncogén	Metaloproteasa (B. Wang et al., 2014).
MMP-9	Disminuida por talidomida ($P < 0.05$)	Oncogén	Metaloproteasa (R. Chen et al., 2012).
Osteopontina	Disminuida por isotretinoína ($P < 0.05$),	Oncogén	Involucrada en procesos de metástasis (Hailin Zhao et al., 2018).
p53	Aumentada por talidomida ($P < 0.05$)	Gen supresor de tumores	Perdida de la estabilidad genómica (Graur et al., 2016).
Prostasina/Prss8	Disminuida por isotretinoína ($P < 0.05$)	Gen supresor de tumores	Proteína relacionada con la regulación de los canales de sodio, la desregulación de esta actividad está asociada con la EMT (Tamir et al., 2016).
E-Selectina	Disminuida por isotretinoína ($P < 0.05$)	Oncogén	Involucrada en procesos de angiogénesis (Borentain et al., 2016).
Snail	Aumentada por isotretinoína y talidomida ($P < 0.01$)	Oncogén	Factor de transcripción involucrado en la EMT e inhibición de la sensibilización a la apoptosis (Wan et al., 2015; Y. Wang, Shi, Chai, Ying, & Zhou, 2013).
Catepsina S	Aumentada por talidomida ($P < 0.05$)	Oncogén	Degradación de la MEC (Xu et al., 2009)
Urokinasa	Disminuida por talidomida ($P < 0.05$)	Oncogén	Es una serina proteinasa que puede promover el crecimiento invasivo y la metástasis activando las metaloproteasas (Wei et al., 2019)
EGF R/ErbB1	Disminuida por isotretinoína y aumentada por talidomida ($P < 0.05$)	Oncogén	Receptor de tirosina quinasa importante en la proliferación y progresión tumoral (Cioca et al., 2014)
HCG	Aumentada por isotretinoína ($P < 0.05$)	Oncogén	gonadotropina coriónica humana es una hormona que facilita la implantación del embrión y en cáncer se ha visto sobreexpresada en algunos tumores sólidos como el HCC y por tanto funcionando como un biomarcador (Li et al., 2018).
Leptina	Aumentada por isotretinoína ($P < 0.01$) y talidomida ($P < 0.05$)	Oncogén	En HCC se asociado a procesos angiogénicos y proliferativos (S. Wang et al., 2010).
Lumican	Disminuida por isotretinoína ($P < 0.05$),	Oncogén	Proteoglicano involucrado en la promoción de la fibrosis hepática (Baghy, Tátrai, Regős, & Kovalszky, 2016).
MCP-2	Disminuida por isotretinoína ($P < 0.05$)	Oncogén	TAM's expresan CCL8, un quimiotáctico de monocitos e impulsa un circuito regulador positivo entre las células cancerosas y los TAM a través de CSF1 y TNF- α (Cassetta et al., 2019)

Los resultados de la inmunodetección en fase sólida no mostraron cambios significativos en los niveles de las proteínas de M-CSF y SNAIL por efecto de los tratamientos isotretinoína y talidomida (Figura 6A y 6B). Por otro lado, debido a que la proteína p53 se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo del cáncer, se decidió evaluar sus niveles de expresión (Figura 6A). Los resultados muestran que los niveles de p53 no están modificados por efecto de los tratamientos de isotretinoína y talidomida (Figura 6B).

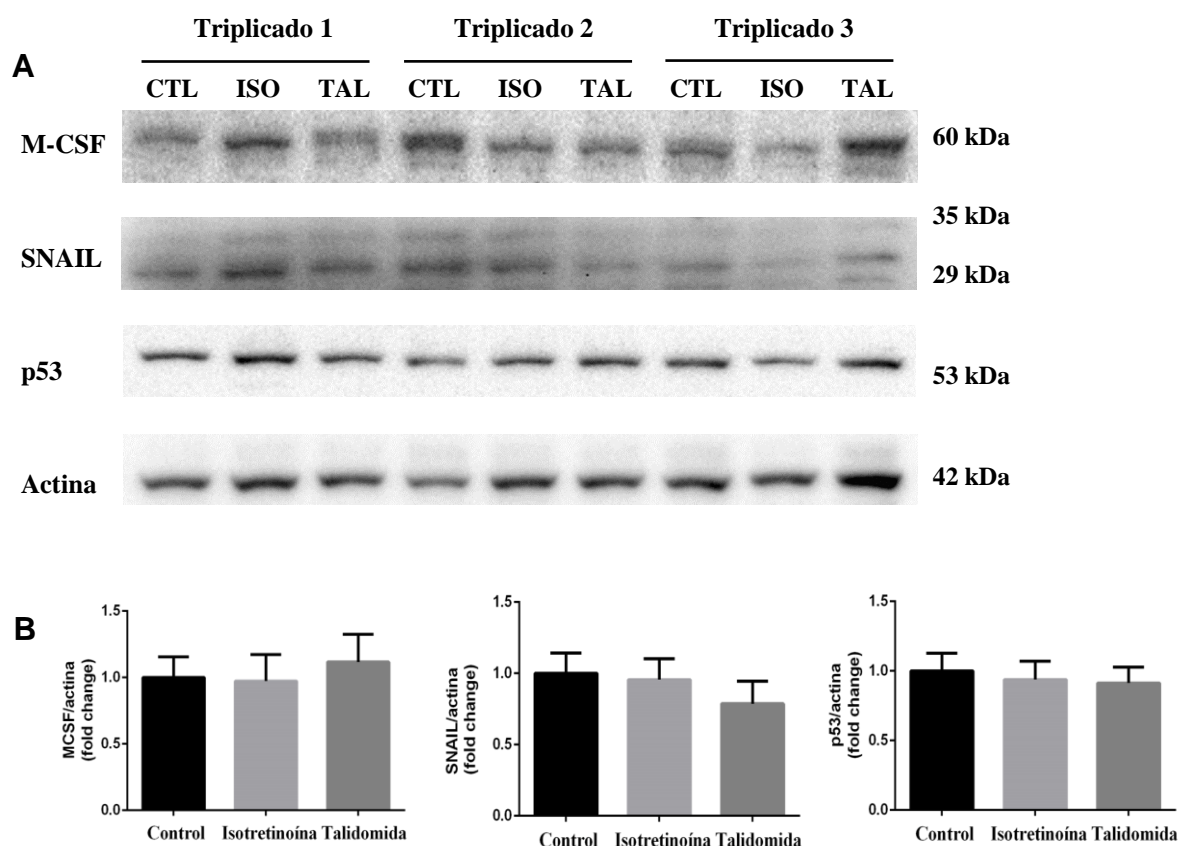


Figura 6. Ensayos de inmunodetección en fase sólida para las proteínas M-CSF, SNAIL y p53 en células HepG2 expuestas a isotretinoína o talidomida por 48 h. (A) Imagen representativa de western blot a partir de extractos proteicos (30 μ g) de células HepG2 por duplicado biológico. Se señalan las bandas y pesos moleculares esperados de las proteínas. (B) Los niveles de proteína obtenidos fueron analizados por medio de Image Studio™ Lite, expresados como *fold change* y normalizados con los niveles detectados para la proteína actina. Las barras de error indican el error estándar de la media (\pm SEM). CT, Control; Iso, Isotretinoína [10 μ M]; Tal, Talidomida [10 μ g/mL]. n=6 por grupo.

Discusión

Al analizar los niveles de expresión génica, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la expresión de *VEGFA*, un factor de crecimiento estimulante de la angiogénesis altamente expresado en cáncer, fue aumentada significativamente ($P < 0.05$) por efecto de talidomida. Sin embargo esto difiere con lo reportado por la literatura (Shen et al., 2019) ya que la expresión de *VEGFA* junto a otros factores proangiogénicos son disminuidos en su expresión por efecto de este fármaco debido a las propiedades antiangiogénicas que posee. Esto pudo deberse a que el número de n utilizado en esta tesis no esté representando fielmente el fenómeno de expresión génica al ser tan pequeño por lo que sería conveniente aumentar la n o de igual manera incrementar la dosis del tratamiento para observar el efecto esperado ya que en otras líneas celulares utilizan dosis de 50 $\mu\text{g/mL}$ para ver el efecto antiangiogénico de talidomida (Zhang & Luo, 2018).

Por el contrario en el caso de los genes *ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *SNAI1* y *CSF1*, se observó que no hay cambios significativos entre el grupo control y los tratamientos. Por ejemplo, en el caso de *TERT*, la mutación más frecuente para el desarrollo del HCC, este no mostró alteración en su expresión génica por efecto de los tratamientos. Sin embargo, en experimentos previos de nuestro grupo de trabajo se observó que ambos tratamientos son capaces de disminuir significativamente la expresión del oncogén *c-Myc* (tesis en proceso), el cual a su vez regula la expresión de *TERT*. Se ha relacionado la expresión de *c-Myc* con adicción oncogénica, haciendo alusión que la supervivencia de las células cancerosas depende de la activación continua de oncogenes mutantes particulares, incluso cuando existe una inactivación del oncogén (Felsher, 2010).

En el ensayo con el arreglo comercial de anticuerpos, el análisis densitométrico mostró alteraciones en la expresión de 27 proteínas, después de 48 h con los tratamientos isotretinoína y talidomida.

En el caso de *VEGFA* no se observó una correlación directa con su producto proteico por efecto de talidomida, lo cual puede deberse a las variaciones entre los transcritos y la abundancia de proteínas humanas, las cuales se han atribuido hasta en un 27% por procesos relacionados a la regulación de la transcripción y degradación del RNA. De igual forma se

ha atribuido que los procesos relacionados con la traducción, modificaciones post-traduccionales y la degradación de proteínas afectan hasta aproximadamente en un 40% esta variación en la abundancia de proteínas humanas e incluso se estima que 33% aún sigue sin poder explicarse (Plotkin, 2010; Vogel et al., 2010). Otro motivo por el cual se puede atribuir esta variabilidad entre la relación del transcrito y producto proteico es por los tiempos en los que se realizaron los tratamientos con los fármacos, donde a tiempos más cortos es posible que se pueda observar esta relación con el producto ya que a las 48 h puede ser que el transcrito ya haya decaído. Esto se relaciona con que las abundancias de proteínas y el mRNA están determinados por las relaciones entre las tasas en la que se producen y degradan las moléculas participantes; por ejemplo, en células de mamíferos, los mRNA's se producen a una velocidad menor que las proteínas, y de manera similar, los mRNA son menos estables que las proteínas, con una vida media promedio de 2.6-7 horas contra 46 horas, respectivamente (Marcotte & Vogel, 2013).

Entre los cambios más representativos obtenidos por efecto de ambos tratamientos, en el ensayo del arreglo comercial, se observó la reducción en la expresión de M-CSF, proteína cuya alta expresión se correlaciona con una baja prognosis del HCC debido a su influencia en la polarización de macrófagos al tipo M2 protumorales (Kono et al., 2016). Así mismo, se observó un aumento significativo en la expresión de Decorina, la cual está involucrada en el bloqueo de receptores importantes en procesos de carcinogénesis, angiogénesis y proliferación (Horváth et al., 2014). De igual forma se incrementó la expresión de ERalpha, un factor de transcripción sobreexpresado en HCC, que reprime la transcripción de la proteína 1 asociada a metástasis (MTA1). Además, p53 una proteína que se ha reportado aumentada en cáncer se redujo significativamente su expresión proteica por efecto de talidomida (Graur et al., 2016). Sin embargo, también se presentaron cambios relacionados a un pronóstico desfavorable en el desarrollo del HCC, como la sobreexpresión de CEACAM5, una proteína relacionada con evitar procesos de Anoikis (Zińczuk et al., 2019) y el aumento del factor de transcripción SNAIL, el cual se asocia con una disminución en la sensibilización de las HepG2 a la apoptosis (Wan et al., 2015), así como el incremento de EMT (Acloque, Adams, Fishwick, Bronner-Fraser, & Nieto, 2009). Por otro lado, se observaron algunos efectos contrarios entre los tratamientos, como la disminución de la expresión de las metaloproteasas

MMP-2 y -9, por efecto de talidomida, las cuales están involucradas en procesos de metástasis por degradación de los componentes de la MEC; y el aumento de Kalikreína 6 por efecto de isotretinoína, la cual también se asocia con dicha degradación (Yu et al., 2015).

La variabilidad en los niveles de expresión proteica pudo deberse al efecto pleiotrópico que poseen los fármacos isotretinoína y talidomida, Los fármacos son capaces de modificar por mecanismos epigenéticos la expresión de proteínas, ya sea de manera directa o indirecta a través de factores de transcripción y rutas de señalización y degradación. Se ha reportado que los compuestos químicos con capacidad epigenética pueden revertir las modificaciones epigenéticas, como los procesos que promueven el desarrollo del cáncer como la proliferación descontrolada y metástasis han mostrado ser revertidos (Qi et al., 2016). Además de lo anterior, el modelo utilizado en este trabajo es una línea celular de hepatoma transformada (Yokoyama et al., 2017) y por tanto está asociada con inestabilidad genética y cambios fenotípicos, como por ejemplo la pérdida de genes supresores de tumores e inactivación de vías de reparación del DNA (Vascotto, Poletto, & Tell, 2016), lo que hace que su fondo genético sea considerado como particular (Hart et al., 2010). Por ejemplo, las proteínas analizadas ARID1A, DKK1 y MMP2 que se han reportado sobreexpresadas en células HepG2, en comparación a la expresión reportada en hepatocitos sanos. Sin embargo, en el caso de MMP2, su expresión disminuyó por efecto de talidomida, lo que sugiere que los tratamientos pudieron potenciar la expresión o represión de algunos genes que ya se encuentran alterados *per se* en el modelo celular (Costantini et al., 2013).

Los arreglos de proteínas son herramientas de detección susceptibles a falsos positivos y falsos negativos, por tanto la reproducibilidad de los resultados del arreglo es otro aspecto importante que debe evaluarse, tanto entre *spots*, (en este caso *spots* por duplicado de cada anticuerpo), así como entre arreglos de proteínas (Veenstra & Yates, 2019). Es por ello que se realizó un duplicado biológico del primer ensayo del arreglo comercial, proveniente de un lote distinto; sin embargo, no se observaron coincidencias en varias de las proteínas previamente analizadas (datos no mostrados). Por otro lado, en algunas proteínas se mantuvo la misma relación de expresión en ambos ensayos como en el caso de la disminución de la expresión de p53, MMP-2 y la uroquinasa por efecto de talidomida.

Los arreglos de proteínas emplean controles positivos y negativos para controlar y evaluar los factores que podrían comprometer los resultados (Kricka, Master, Joos, & Fortina, 2006). Los ensayos basados en la técnica de ELISA del tipo sándwich suelen ser muy sensibles y específicos, ya que en estos utilizan un cóctel de anticuerpos de detección biotinilados para detectar los niveles de las proteínas objetivo capturadas de manera simultánea, de modo que las cantidades unidas a la matriz se pueden medir usando estreptavidina marcada con una enzima como la peroxidasa de rábano, para su posterior revelado y lectura (Haab, 2006). Sin embargo, a pesar de estas ventajas y controles, también tienen desventajas como la contaminación de la señal en áreas adyacentes, lo cual dificulta la cuantificación de la quimioluminiscencia (Lal, Christopherson, Remedios, & Cristobal, 2002). Otra desventaja es que los *spots* con niveles muy bajos pueden ser considerados como falsos negativos (Veenstra & Yates, 2019). Relacionado a esto, para nuestros ensayos la quimioluminiscencia se reveló por medio de una película de rayos X en un cuarto oscuro. Se ha reportado que es preferible el uso de un generador de imágenes CCD (dispositivo de carga acoplada), ya que produce un rango dinámico lineal más grande que con la película y esta diferencia probablemente se deba a la saturación de la película de rayos X por muestras de alta intensidad al intentar detectar también las muestras de menor intensidad, mientras que un generador de imágenes CCD, utiliza un sistema de adquisición de imágenes computarizado y es capaz de detectar señales de baja intensidad sin que las señales de alta intensidad se saturen tan rápido como con la película de rayos X (Degasperri, Birtwistle, Volinsky, Rauch, & Kolch, 2014). Los ensayos funcionales realizados en arreglos de proteínas deben validarse utilizando los ensayos estándar de oro correspondientes (Veenstra & Yates, 2019). Por lo cual se realizó confirmación por medio de ensayos de western blot para las proteínas M-CSF y SNAIL, seleccionadas por ser las proteínas más alteradas significativamente en el ensayo del arreglo comercial por efecto de ambos tratamientos. Además se realizó la detección de los niveles de p53 por Western blot debido a su relevancia en el desarrollo de cualquier tipo de cáncer y a que su expresión se disminuyó en el arreglo comercial, a pesar de no estar mutado en la línea celular HepG2 (Y. R. Lee & Park, 2015). Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas para ninguna de estas tres proteínas por efecto de los tratamientos isotretinoína y talidomida, lo cual puede atribuirse a algunas incongruencias presentadas entre los ensayos del arreglo comercial, estrechamente relacionados a la

susceptibilidad que tienen los arreglos a proporcionar falsos positivos y falsos negativos (Lal et al., 2002; Veenstra & Yates, 2019).

Conclusiones:

- La administración del tratamiento talidomida por 48 h en la línea celular HepG2 incrementó la expresión del mRNA del gen *VEGFA*.
- En las células HepG2, los fármacos isotretinoína y talidomida modificaron la expresión de 27 proteínas relacionadas con la etiología, desarrollo y pronóstico del cáncer, utilizando un arreglo comercial para la detección simultánea de proteínas.
- A partir de los ensayos del arreglo comercial de proteínas, se observó una disminución e incremento altamente significativo de las proteínas M-CSF y SNAIL, respectivamente.
- Los ensayos confirmativos de inmunodetección en fase sólida para las proteínas M-CSF, SNAIL y p53 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos por isotretinoína y talidomida con respecto al control.

Perspectivas:

- Evaluar el efecto de los tratamientos isotretinoína y talidomida sobre los niveles de expresión de los genes evaluados en este trabajo bajo diferentes condiciones de tiempos de incubación.
- Evaluar el efecto de los tratamientos isotretinoína y talidomida sobre los niveles de expresión de los genes evaluados en este trabajo en otras líneas celulares modelo de hepatocarcinoma.
- Evaluar el efecto de los tratamientos isotretinoína y talidomida sobre la regresión tumoral en un modelo animal *in vivo*.

Material suplementario

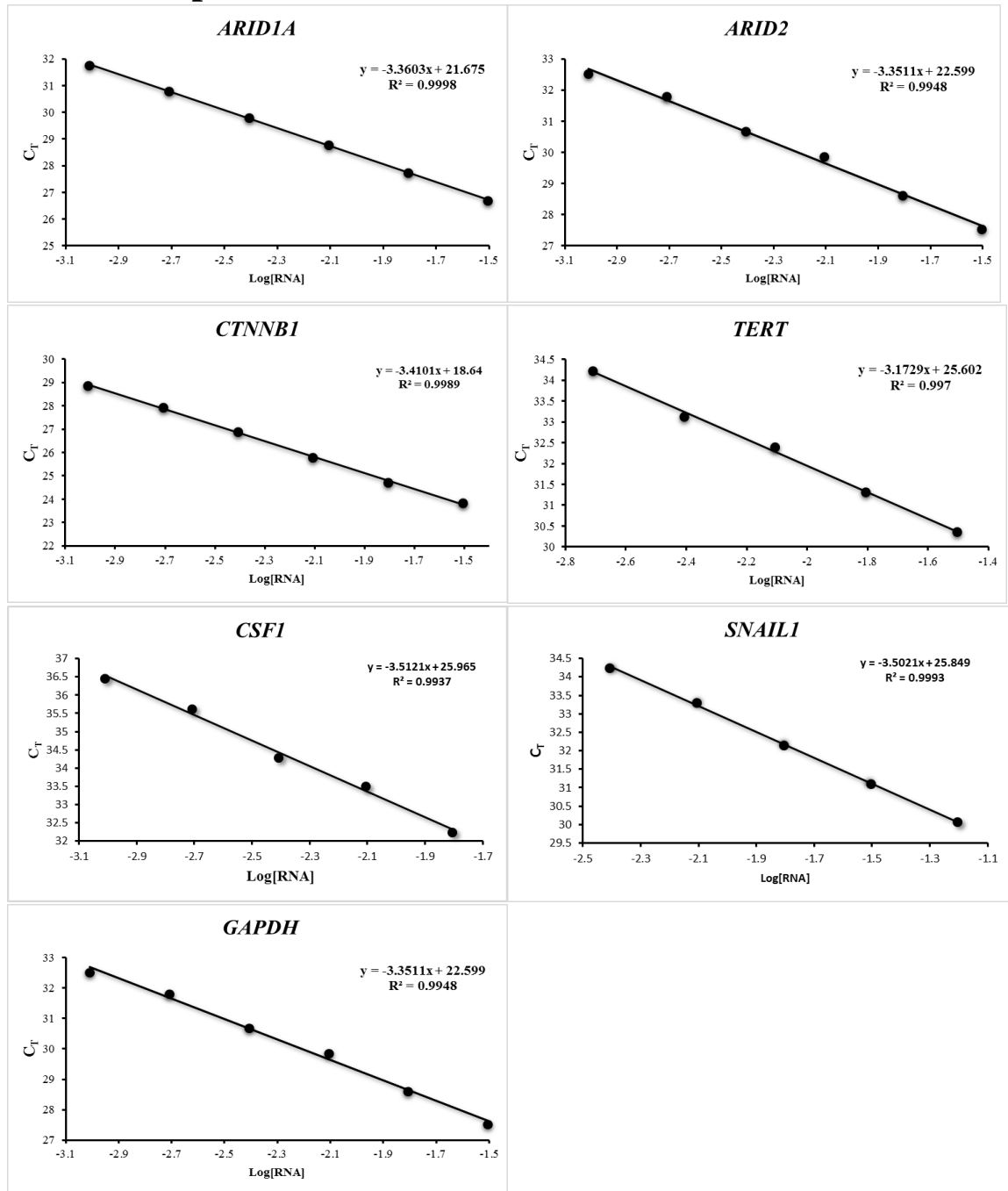


Figura S1. Análisis de regresión lineal de la eficiencia de amplificación de los genes *ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *CSF1*, *SNAIL1* y el control endógeno *GAPDH*. C_t , representa el ciclo del umbral de detección y log [RNA] representa la concentración de RNA expresado en escala logarítmica base 10 correspondiente a las diluciones de cDNA utilizadas. La pendiente (y) y el valor predictivo (R^2) indican la eficiencia de amplificación cercana al 100% y una buena correlación entre el C_t y la concentración de cDNA, respectivamente.

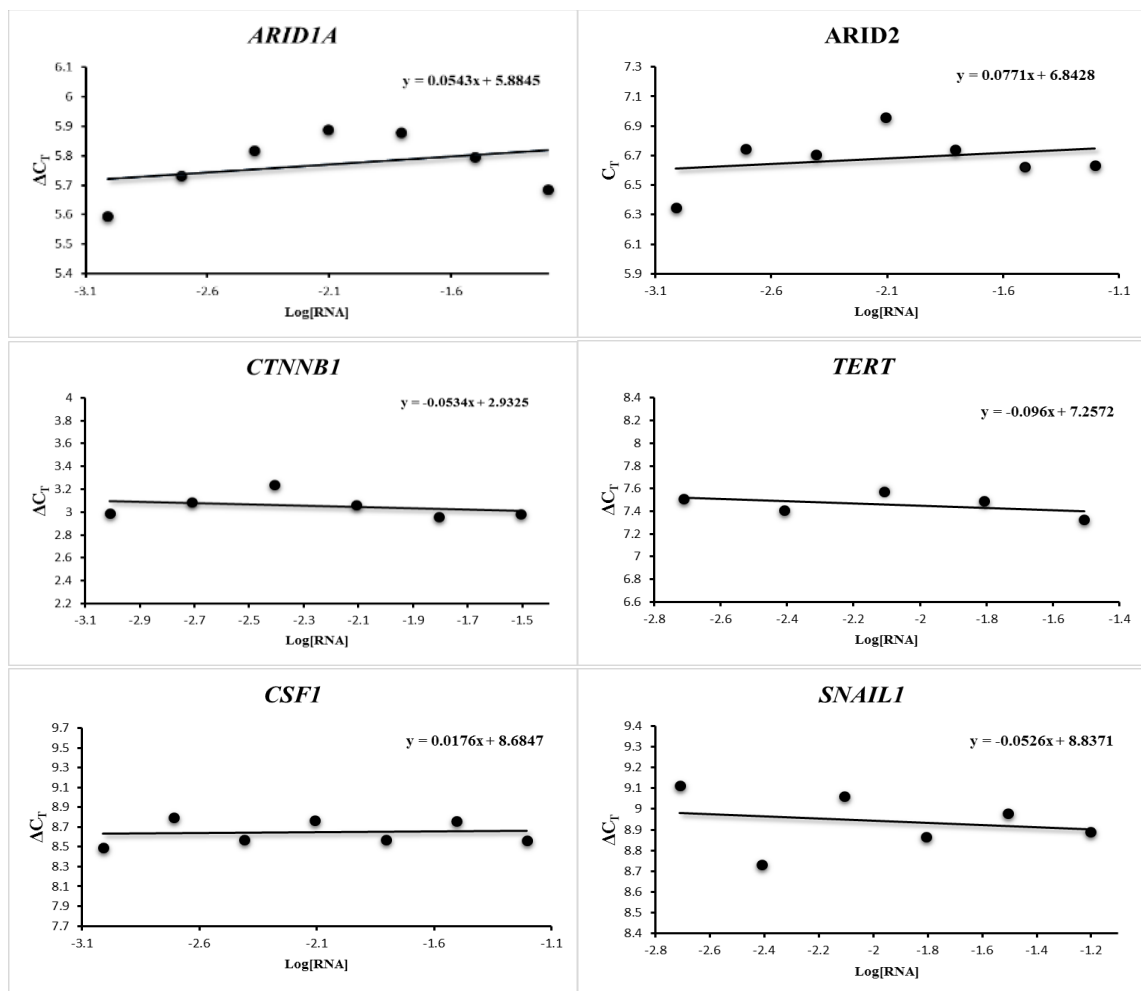
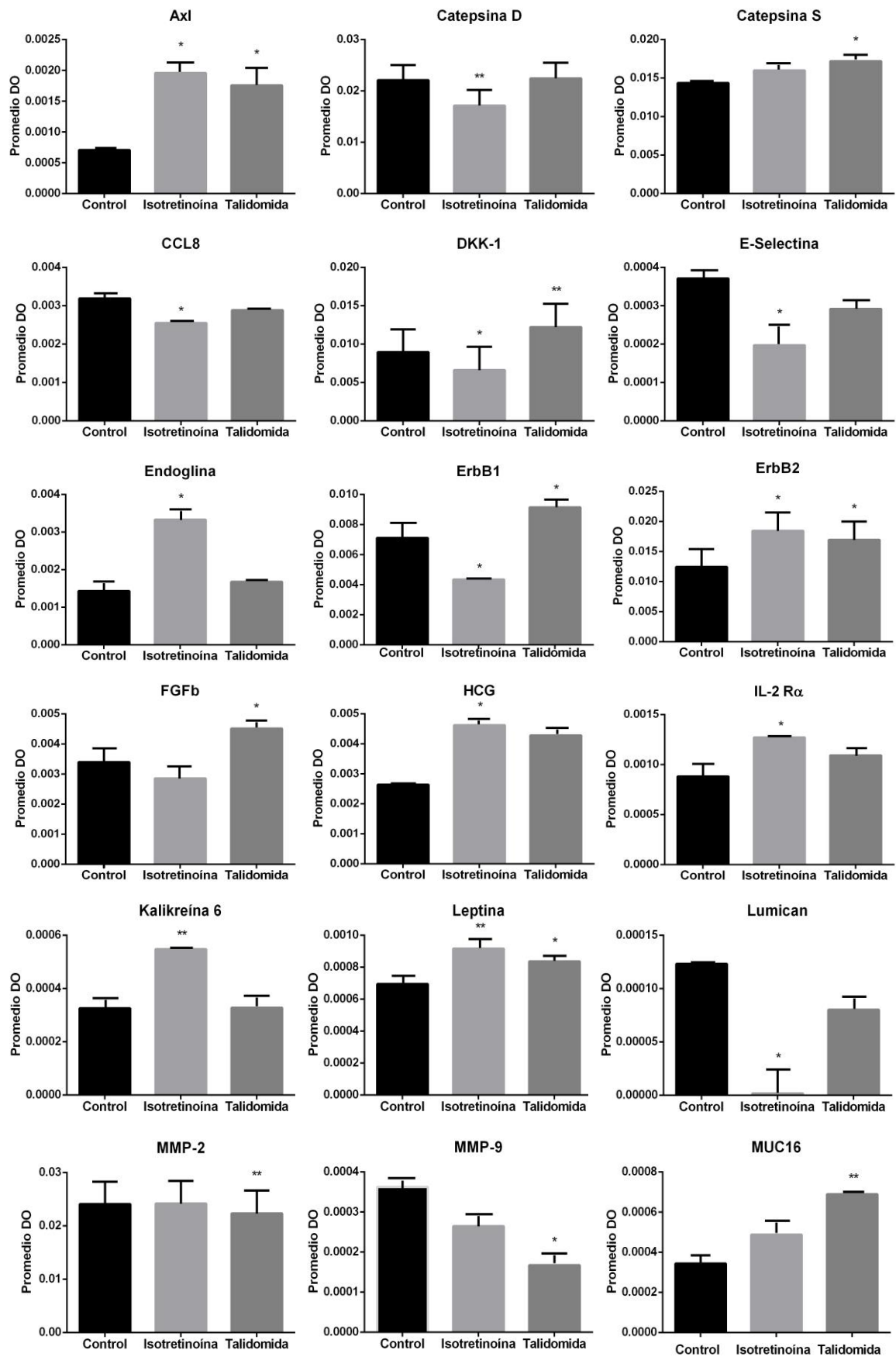


Figura S2. Análisis de regresión lineal de la eficiencia de amplificación de los genes *ARID1A*, *ARID2*, *CTNNB1*, *TERT*, *CSF1*, *SNAIL1* respecto al control endógeno *GAPDH*. ΔC_T representa la diferencia entre el ciclo umbral de genes blanco y el CT del control endógeno; Log [RNA] representa la concentración de RNA expresado en escala logarítmica base 10 correspondiente a las diluciones de cDNA utilizadas. Se muestra la ecuación de la pendiente (y).



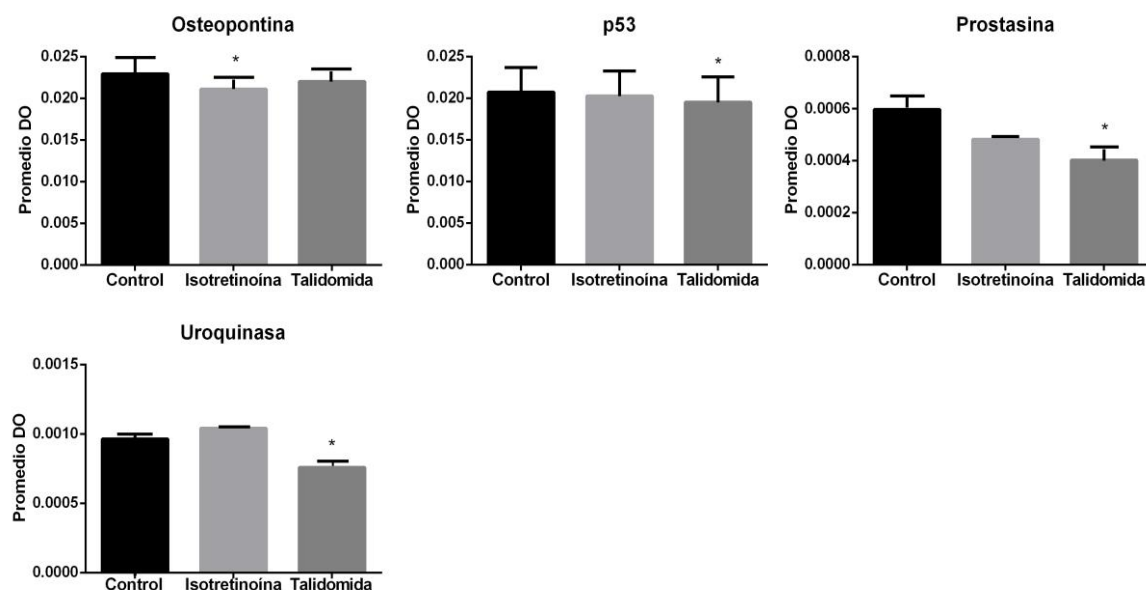


Figura S3. Proteínas modificadas en sus niveles de expresión relativa, por efecto de los fármacos isotretinoína y talidomida, del primer ensayo con el arreglo comercial de anticuerpos. Se muestran las 22 proteínas no seleccionadas para estudios posteriores. La expresión proteica fue evaluada después de 48 h con los tratamientos. El análisis se realizó por medio de Fiji, expresado como valor medio de la densidad óptica (DO) de la expresión relativa proteica. Las barras indican el error estándar de la media (\pm SME). Isotretinoína [10 μ M]; Talidomida [10 μ g/mL]. * ($P < 0.05$), ** ($P < 0.01$) y *** ($P < 0.001$)

Tabla S1. Identificación (ID) de los ensayos de expresión genética utilizados en este estudio.

Gen	ID	Número de Catalogo
<i>CTNNB1</i>	<u>Hs00355045_m1</u>	<u>4331182</u>
<i>TERT</i>	<u>Hs00972650_m1</u>	<u>4331182</u>
<i>VEGFA</i>	<u>Hs00900055_m1</u>	<u>4331182</u>
<i>ARID1A</i>	<u>Hs00195664_m1</u>	<u>4331182</u>
<i>ARID2</i>	<u>Hs00326029_m1</u>	<u>4331182</u>
<i>GAPDH</i>	<u>Hs99999905_m1</u>	<u>4331182</u>

Tabla S2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunodetección en fase sólida.

Anticuerpos	Marca	Dilución
Actina	Abcam	1:2000 (en TBST 1X)
M-CSF	USBiological	1:10000 (en TBST 1X)
SNAIL	Bioworld Technology	1:4000(en leche al 5%)
p53	Abcam	1:1000(en TBST 1X)
Peroxidase-labeled anti-mouse antibody	GE Healthcare	1:20000 (en TBST 1X)
Mouse anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	1:5000 (en leche 5%)

Referencias

- Acloque, H., Adams, M. S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1438–1449. <https://doi.org/10.1172/JCI38019>
- American Cancer, S. (2016). Cáncer de hígado. *American Cancer Society*, 54.
- Anwar, S. L., Krech, T., Hasemeier, B., Schipper, E., Schweitzer, N., Vogel, A., Lehmann, U. (2014). Deregulation of RB1 expression by lo1. Anwar SL, Krech T, Hasemeier B, Schipper E, Schweitzer N, Vogel A, et al. Deregulation of RB1 expression by loss of imprinting in human hepatocellular carcinoma. *J Pathol*. 2014;233(4):392–401. ss of imprinting in hum. *Journal of Pathology*, 233(4), 392–401. <https://doi.org/10.1002/path.4376>
- Baghy, K., Tátrai, P., Regős, E., & Kovalszky, I. (2016). Proteoglycans in liver cancer, 22(1), 379–393. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i1.379>
- Borentain, P., Carmona, S., Mathieu, S., Jouve, E., El-Battari, A., & Gérolami, R. (2016). Inhibition of E-selectin expression on the surface of endothelial cells inhibits hepatocellular carcinoma growth by preventing tumor angiogenesis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(4), 847–856. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3006-x>
- Borja-Cacho, D., & Matthews, J. (2008). NIH Public Access. *Nano*, 6(9), 2166–2171. <https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell>
- Bray, F., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2018). Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brzezinski, P. (2017). Adverse effects of isotretinoin : A large , retrospective review, (November 2016), 2–7. <https://doi.org/10.1111/dth.12483>
- Cassetta, L., Fragkogianni, S., Sims, A. H., Coussens, L. M., Smith, H. O., & Pollard, J.

- W. (2019). Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming , Biomarkers , and Therapeutic Targets. *Cancer Cell*, 35(4), 588-602.e10. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.009>
- Chen, L., Li, M., Li, Q., Wang, C., & Xie, S. (2013). DKK1 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion through β -catenin/MMP7 signaling pathway. *Molecular Cancer*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-157>
- Chen, R., Cui, J., Xu, C., Xue, T., Guo, K., Gao, D., Ren, Z. (2012). The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Annals of Surgical Oncology*, 19(SUPPL. 3), 7–16. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1836-7>
- Cioca, A., Cimpean, A., Ceausu, R., Fit, A., Al-hajjar, N., Puia, V., & Raica, M. (2014). Crosstalk between EGFR and p53 in Hepatocellular Carcinoma, 15, 8069–8073.
- Costantini, S., Di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G., & Colonna, G. (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*, 518(2), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106>
- Degasperi, A., Birtwistle, M. R., Volinsky, N., Rauch, J., & Kolch, W. (2014). Evaluating Strategies to Normalise Biological Replicates of Western Blot Data, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087293>
- Deng, L., Yang, H., Tang, J., Lin, Z., Yin, A., Gao, Y., Sun, B. (2015). Inhibition of MTA1 by ER α contributes to protection hepatocellular carcinoma from tumor proliferation and metastasis. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0248-0>
- Dhanasekaran, R., Bandoh, S., & Roberts, L. R. (2016). Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma and impact of therapeutic advances. *F1000Research*, 5(May), 879. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6946.1>
- Di Fiore, R., D’Anneo, A., Tesoriere, G., & Vento, R. (2013). RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis.

- Journal of Cellular Physiology*, 228(8), 1676–1687. <https://doi.org/10.1002/jcp.24329>
- Dimopoulos, M. A., & Eleutherakis-papaiakovou, V. (2004). Adverse Effects of Thalidomide Administration in Patients with Neoplastic Diseases. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.03.040>
- Felsher, D. W. (2010). MYC Inactivation Elicits Oncogene Addiction through Both Tumor Cell – Intrinsic and Host-Dependent Mechanisms, 597–604. <https://doi.org/10.1177/1947601910377798>
- Feng, X., Li, B., Ye, H., & Long, D. (2011). Increased frequency of CD4 + CD25 high FoxP3 + regulatory T cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 59(4), 309–314. <https://doi.org/10.1007/s00005-011-0127-0>
- Gao, S., Wang, S., Fan, R., & Hu, J. (2020). Biomedicine & Pharmacotherapy Recent advances in the molecular mechanism of thalidomide teratogenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127(February), 110114. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110114>
- Globocan. (2018). Globocan 2018: México, 283, 2018–2019.
- González Huezo, M. S., & Sánchez Ávila, J. F. (2014). Mexican consensus on the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 79(4), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.rgmxe.2014.12.002>
- Graur, F., Furcea, L., Mois, E., Biliuta, A., Rozs, A. T., Negrean, V., & Hajjar, N. Al. (2016). Analysis of p53 protein expression in hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 25(3), 345–349. <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.253.p53>
- Haab, B. B. (2006). Applications of antibody array platforms, 415–421. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.06.013>
- Hart, S. N., Li, Y., Nakamoto, K., Subileau, E. A., Steen, D., & Zhong, X. B. (2010). A

- comparison of whole genome gene expression profiles of HepaRG cells and HepG2 cells to primary human hepatocytes and human liver tissues. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(6), 988–994. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.031831>
- He, F., Li, J., Xu, J., Zhang, S., Xu, Y., Zhao, W., ... Wang, X. (2015). Decreased expression of ARID1A associates with poor prognosis and promotes metastases of hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0164-3>
- Horváth, Z., Kovalszky, I., Fullár, A., Kiss, K., Schaff, Z., Iozzo, R. V., & Baghy, K. (2014). Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis. *Matrix Biology*, 35, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.11.004>
- Huang, X. F., Wang, C. M., Dai, X. W., Li, Z. J., Pan, B. R., Yu, L. B., ... Fang, L. (2000). Expressions of chromogranin A and cathepsin D in human primary hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 6(5), 693–698. <https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i5.693>
- Jiang, K., Al-Diffhala, S., & Centeno, B. A. (2018). Primary liver cancers—Part 1: Histopathology, differential diagnoses, and risk stratification. *Cancer Control*, 25(1), 1–26. <https://doi.org/10.1177/1073274817744625>
- Jones, S., Li, M., Williams Parsons, D., Zhang, X., Wesseling, J., Kristel, P., ... Papadopoulos, N. (2012). Somatic mutations in the chromatin remodeling gene ARID1A occur in several tumor types. *Human Mutation*, 33(1), 100–103. <https://doi.org/10.1002/humu.21633>
- Karaman, S., Leppänen, V.-M., & Alitalo, K. (2018). Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development*, 145(14), dev151019. <https://doi.org/10.1242/dev.151019>
- Kasprzak, A., & Adamek, A. (2018). Role of endoglin (CD105) in the progression of hepatocellular carcinoma and anti-angiogenic therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19). <https://doi.org/10.3390/ijms19123887>

- Khan, F. S., Ali, I., Afridi, U. K., Ishtiaq, M., & Mehmood, R. (2017). Epigenetic mechanisms regulating the development of hepatocellular carcinoma and their promise for therapeutics. *Hepatology International*, 11(1), 45–53.
<https://doi.org/10.1007/s12072-016-9743-4>
- Kono, H., Fujii, H., Furuya, S., Hara, M., Hirayama, K., Akazawa, Y., ... Sun, C. (2016). Macrophage colony-stimulating factor expressed in non-cancer tissues provides predictive powers for recurrence in hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 22(39), 8779–8789. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8779>
- Kricka, L. J., Master, S. R., Joos, T. O., & Fortina, P. (2006). Current perspectives in protein array technology. *The Association for Clinical Biochemistry*, 457–467.
- Kufe, D. W. (2009). Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*, 9(12), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Lal, S. P., Christopherson, R. I., Remedios, C. G., & Cristobal, G. (2002). Antibody arrays : an embryonic but rapidly growing technology. *Drug Discovery Today*, 7(18), 143–149.
- Lee, H. J., Jeng, Y. M., Chen, Y. L., Chung, L., & Yuan, R. H. (2014). Gas6/Axl pathway promotes tumor invasion through the transcriptional activation of slug in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 35(4), 769–775.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgt372>
- Lee, S., Chang, S., Kim, W. Y., Lim, S. D., Kim, W. S., Hwang, T. S., & Han, H. S. (2016). Frequent somatic TERT promoter mutations and CTNNB1 mutations in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(43), 1–9.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12121>
- Lee, Y. R., & Park, S. Y. (2015). P53 expression in hepatocellular carcinoma : influence on the radiotherapeutic response of the hepatocellular carcinoma, 230–231.
- Li, J., Yin, M., Song, W., Cui, F., Wang, W., Wang, S., & Zhu, H. (2018). B Subunit of Human Chorionic Gonadotropin Promotes Tumor Invasion and Predicts Poor

- Prognosis of Early-Stage Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem*, 45, 237–249.
<https://doi.org/10.1159/000486770>
- Liu, M., Jiang, L., & Guan, X.-Y. (2014). The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein & Cell*, 5(9), 673–691.
<https://doi.org/10.1007/s13238-014-0065-9>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Marcotte, E. M., & Vogel, C. (2013). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses, 13(4), 227–232.
<https://doi.org/10.1038/nrg3185>.Insights
- Martinez-Mier, G., Esquivel-Torres, S., Medina Granados, J. P., Luna-Castillo, M., Castillo-Chiquete, R., Calzada-Grijalva, J. F., & Gonzalez-Velazquez, F. (2014). Presentation, staging, and outcome of patients with hepatocellular carcinoma at a center in Veracruz, Mexico. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 79(3), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.rgmxe.2014.09.004>
- McGlynn, K. A., Petrick, J. L., & London, W. T. (2015). Global Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma: An Emphasis on Demographic and Regional Variability. *Clinics in Liver Disease*, 19(2), 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2015.01.001>
- Melnik, B. C. (2017). Apoptosis May Explain the Pharmacological Mode of Action and Adverse Effects of Isotretinoin, Including Teratogenicity. *Acta Derm Venereol*, 97, 173–181. <https://doi.org/10.2340/00015555-2535>
- Mittal, S., & El-Serag, H. B. (2013). Epidemiology of HCC: Consider the Population. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 47(0), 1–10.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182872f29>.Epidemiology
- Plotkin, J. B. (2010). Transcriptional regulation is only half the story. *Molecular Systems Biology*, 6(406),

- 1–2. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.63story>. *Molecular Systems Biology*, 6(406), 1–2. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.63>
- Qi, Y., Wang, D., Wang, D., Jin, T., Yang, L., Wu, H., ... Wang, R. (2016). HEDD: The human epigenetic drug database. *Database*, 2016, 1–10. <https://doi.org/10.1093/database/baw159>
- Rao, C. V, Asch, A. S., & Yamada, H. Y. (2017). Frequently mutated genes / pathways and genomic instability as prevention targets in liver cancer, 38(1), 2–11. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw118>
- Sachiko, O., Hirohisa, Y., Koichi, H., Akiko, T., Jun, A., Koji, S., & Masamichi, K. (2001). Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in human biliary tract carcinoma cell lines. *Hepatology Research*, 20(1), 97–113. <https://doi.org/10.1016/S1386-6346%2800%2900117-0>
- Schulze, K., Nault, J. C., & Villanueva, A. (2016). Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *Journal of Hepatology*, 65(5), 1031–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.035>
- Shahreza, M. L., Ghadiri, N., Mousavi, S. R., Varshosaz, J., & Green, J. R. (2017). OUP accepted manuscript. *Briefings In Bioinformatics*, (January), 1–15. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx131>
- Shen, Y., Li, S., Wang, X., Wang, M., Tian, Q., Yang, J., ... Wang, B. (2019). Tumor vasculature remodeling by thalidomide increases delivery and efficacy of cisplatin, 1–16.
- Shi, J. H., Guo, W. Z., Jin, Y., Zhang, H. P., Pang, C., Li, J., ... Zhang, S. J. (2019). Recognition of HER2 expression in hepatocellular carcinoma and its significance in postoperative tumor recurrence. *Cancer Medicine*, 8(3), 1269–1278. <https://doi.org/10.1002/cam4.2006>
- Shibata, T., & Aburatani, H. (2014). Exploration of liver cancer genomes. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(6), 340–349.

<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.6>

- Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S. L., & Llovet, J. M. (2017). Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*, 152(4), 745–761. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.048>
- Sudulaguntla, A., Joy, J., M, M. R. K., & Vinod, N. (2018). A Review : Uses of
oSudulaguntla, A., Joy, J., M, M. R. K., & Vinod, N. (2018). A Review : Uses of
Thalidomide in Cancer Treatment, 8(1), 1–5.f Thalidomide in Cancer Treatment, 8(1), 1–5.
- Szyf, M. (2009). Epigenetics, DNA Methylation, and Chromatin Modifying Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49(1), 243–263. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-061008-103102>
- Tamir, A., Gangadharan, A., Balwani, S., Tanaka, T., Patel, U., Hassan, A., Suh, K. S. (2016). The serine protease prostaticin (PRSS8) is a potential biomarker for early detection of ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13048-016-0228-9>
- Tang, A., Hallouch, O., Chernyak, V., Kamaya, A., & Sirlin, C. B. (2018). Epidemiology of hepatocellular carcinoma: target population for surveillance and diagnosis. *Abdominal Radiology*, 43(1), 13–25. <https://doi.org/10.1007/s00261-017-1209-1>
- Tyakht, A. V, Ilina, E. N., Alexeev, D. G., Ischenko, D. S., Gorbachev, A. Y., Semashko, T. A., ... Govorun, V. M. (2014). RNA-Seq gene expression profiling of HepG2 cells: the influence of experimental factors and comparison with liver tissue. *BMC Genomics*, 15, 1108. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1108>; [10.1186/1471-2164-15-1108](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1108)
- Vascotto, C., Poletto, M., & Tell, G. (2016). Understanding the basics for translating the base excision repair pathway from benchtop to bedside in cancer treatment. DNA Repair in Cancer Therapy: Molecular Targets and Clinical Applications: Second Edition (Second Edition). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803582-5.00003-6>

- Veenstra, T. D., & Yates, J. R. (2019). Protein Microarrays, 29–61.
- Verma, M., & Kumar, V. (2018). *Epigenetic Drugs for Cancer and Precision Medicine. Epigenetics of Aging and Longevity*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811060-7.00021-8>
- Vogel, C., Abreu, R. D. S., Ko, D., Le, S., Shapiro, B. A., Burns, S. C., Penalva, L. O. (2010). Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Molecular Systems Biology*, 6(400), 1–9. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.59>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Wahid, B., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2017). New Insights into the Epigenetics of Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1609575>
- Wan, Z., Pan, H., Liu, S., Zhu, J., Qi, W., Fu, K., Liang, J. (2015). Downregulation of SNAIL sensitizes Hepatocellular carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the NF- κ B pathway. *Oncology Reports*, 33(3), 1560–1566. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3743>
- Wang, B., Ding, Y. M., Fan, P., Wang, B., Xu, J. H., & Wang, W. X. (2014). Expression and significance of MMP2 and HIF-1 α in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, 8(2), 539–546. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2189>
- Wang, L., Zhang, X., Jia, L. T., Hu, S. J., Zhao, J., Yang, J. D., Yang, A. G. (2014). C-Myc-mediated epigenetic silencing of MicroRNA-101 contributes to dysregulation of multiple pathways in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 59(5), 1850–1863. <https://doi.org/10.1002/hep.26720>
- Wang, S., Lee, K. T., Ker, C., Wang, S., Lee, K., & Ker, C. (2010). Leptin in hepatocellular carcinoma, 16(46), 5801–5809. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i46.5801>

- Wang, W., Pan, Q., Fuhler, G. M., Smits, R., & Peppelenbosch, M. P. (2017). Action and function of Wnt/ β -catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 52(4), 419–431.
<https://doi.org/10.1007/s00535-016-1299-5>
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & Zhou, B. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 13(9), 963–972.
<https://doi.org/10.2174/15680096113136660102>
- Wei, L., Lun, Y., Zhou, X., He, S., Gao, L., Liu, Y., Wang, C. (2019). Novel urokinase-plasminogen activator inhibitor SPINK13 inhibits growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in vivo. *Pharmacological Research*, 143(January), 73–85.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.03.009>
- Wen, W., Chen, W. S., Xiao, N., Bender, R., Ghazalpour, A., Tan, Z., Press, M. F. (2015). Mutations in the kinase domain of the HER2/ERBB2 gene identified in a wide variety of human cancers. *Journal of Molecular Diagnostics*, 17(5), 487–495.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.003>
- Wiegand, U., & Chou, R. C. (1982). Pharmacokinetics of oral isotretinoin, 8–12.
- Wu and Roberts. (2013). NIH Public Access. *Cancer Discovery*, 3(1), 35–43.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0361.ARID1A>
- Xu, J., Li, D., Ke, Z., Liu, R., Maubach, G., & Zhuo, L. (2009). Cathepsin S is aberrantly overexpressed in human hepatocellular carcinoma, 713–718.
<https://doi.org/10.3892/mmr>
- Yokoyama, M., Chiba, T., Zen, Y., Oshima, M., Kusakabe, Y., Noguchi, Y., Iwama, A. (2017). Histone lysine methyltransferase G9a is a novel epigenetic target for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 8(13), 21315–21326.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15528>
- Yu, Y., Li, H., Zhang, B., Pan, X., Zhu, X., Ding, Y., & Li, G. (2015). Peptide network for detection of tissue-remodeling enzyme in the prognosis of hepatocellular carcinoma.

ACS Applied Materials and Interfaces, 7(7), 4401–4405.

<https://doi.org/10.1021/am5089378>

- Zahran, M. A. H., Gamal-eldeen, A. M., & Agwa, H. S. (2014). Thalidomide dithiocarbamate and dithioate derivatives induce apoptosis through inhibition of histone deacetylases and induction of caspases. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2014.03.003>
- Zhang, X., & Luo, H. (2018). Effects of thalidomide on growth and VEGF - A expression in SW480 colon cancer cells. *Oncology Letters*, 15, 3313–3320. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7645>
- Zhao, Hailin, Chen, Q., Alam, A., Cui, J., Suen, K. C., Soo, A. P., Ma, D. (2018). The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death and Disease*, 9(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0391-6>
- Zhao, Hong, Wang, J., Han, Y., Huang, Z., Ying, J., Bi, X., Cai, J. (2011). ARID2: a new tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 2(11), 886–891. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.355>
- Zhu, J., Feng, A., Sun, J., Jiang, Z., Zhang, G., Wang, K., Qu, X. (2011). Increased CD4+CD69+CD25- T cells in patients with hepatocellular carcinoma are associated with tumor progression. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 26(10), 1519–1526. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06765.x>
- Zińczuk, J., Zaręba, K., Romaniuk, W., Kamińska, D., Nizioł, M., Baszun, M., ... Pryczynicz, A. (2019). Expression of chosen carcinoembryonic-related cell adhesion molecules in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) associated with chronic pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). *International Journal of Medical Sciences*, 16(4), 583–592. <https://doi.org/10.7150/ijms.32751>
- Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J. C., & Llovet, J. M. (2015). Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, 149(5), 1226–1239. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.05.061>

Resumen bibliográfico

Patricia Nefertari Ramírez Flores

Candidata para el grado de Maestra en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: LOS FÁRMACOS EPIGENÉTICOS ISOTRETINOÍNA Y TALIDOMIDA MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE GENES Y PROTEÍNAS RELACIONADAS CON LA ETIOLOGÍA, DESARROLLO Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER EN LA LÍNEA CELULAR HepG2

Campo de estudio: Biología Molecular del Cáncer.

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, México, el 4 de Noviembre de 1994, hija de Carlos Fernando Ramírez Tovar e Isidra Flores Cedillo.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el grado de Licenciada en Biotecnología Genómica en 2018

